

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平11-502935

(43) 公表日 平成11年(1999) 3月9日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

F I

G 0 1 N 21/35

G 0 1 N 21/35

Z

1/28

1/30

1/30

33/48

M

33/48

33/483

C

33/483

33/50

T

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 79 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-518997  
 (86) (22) 出願日 平成8年(1996)11月12日  
 (85) 翻訳文提出日 平成10年(1998)5月13日  
 (86) 国際出願番号 PCT/US96/18116  
 (87) 国際公開番号 WO97/18566  
 (87) 国際公開日 平成9年(1997)5月22日  
 (31) 優先権主張番号 08/558, 130  
 (32) 優先日 1995年11月13日  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 バイオーラッド ラボラトリーズ, インコーポレイティド  
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 94547, ハークルス, アルフレッド ノベル ドライブ 1000  
 (72) 発明者 コヘンフォード, メナシ エー.  
 アメリカ合衆国, ロードアイランド 02893, ウェスト ワーウィック, コールド スプリング ドライブ 1  
 (74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外4名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 フーリエ変換赤外分光法を用いて細胞の異常を検出するための方法

(57) 【要約】

本発明は、病状に関連する細胞の異常を同定する方法を教授する。1つの態様において、本発明は、正常な頸部細胞から頸部の癌の前悪性及び悪性段階を区別する方法である。その方法は、赤外透過性マトリックス上で乾燥し、 $3000\sim 950\text{cm}^{-1}$ の周波数域でスキャンする剥離した頸部細胞の赤外 (IR) スペクトルを利用する。サンプルの同定は、正常、形成異常及び悪性試料のスペクトルの典型的なセットを用いて検定を確立することに基づく。検定の過程の間、主成分分析 (PCA) 及び/又は部分最小二乗 (PLS) のような多変量技術が用いられる。PCA 及び PLS は、スペクトル間の最大変化に基づくデータを還元し、異なる集団を示す多次元空間においてクラスターを形成する。Mahalanobis ディスタンス又は線形回帰の利用 (例えば PCA からの還元されたデータに基づく主成分回帰) は識別のための基礎を形成する。この方法は、簡単に用いられ、次の群の頸部スミア：正常 (形成異常の前歴のない個体)、形成異常及び悪性サンプル間の統計的に信頼できる区別を行う。更に、本発明は、赤外透過性マトリックス上に固定された個々の頸部細胞の IR スペ

クトルを得る方法及び上述の方法において個々の細胞のスペクトルを用いる方法を開示する。更なる態様において、本発明は、正常及び病気の細胞間を区別するために振動分光イメージングを用いるための方法である。

## 【特許請求の範囲】

1. 剥離した頸部細胞サンプル内の悪性又は前悪性状態を同定するための方法であって、

(a) 赤外透過性マトリックス上で前記剥離頸部細胞サンプルを乾燥させて乾燥細胞サンプルを作るステップと、

(b) 約3000～約950 $\text{cm}^{-1}$ の周波数を有する中赤外光のビームを前記乾燥細胞サンプルにあてて、該乾燥細胞サンプルについての吸収データを作り出すステップと、

(c) 前記乾燥細胞サンプルについての前記吸収データを赤外吸収データの検定／標準セットと比較して、前記悪性又は前悪性状態の特徴である赤外吸収における変化が、少なくとも1の周波数の範囲において前記乾燥細胞サンプル内でおこるか否かを決定するステップであって、前記比較が部分最小二乗法又は主成分分析統計法を利用し、そして前記吸収データが誘導化されておらずかつ平滑化されておらず、それにより前記悪性又は前悪性状態の同定を行うステップと、

を含む方法。

2. 前記赤外吸収データの検定／標準セットが、正常、形成異常及び悪性の頸部細胞の典型的なセットからのものであることを特徴とする請求項1に記載の方法。

3. 前記比較が、主成分分析を用いて行われる主成分回帰を利用することを特徴とする請求項1に記載の方法。

4. 前記検定／標準セットが約100～約1000の標準細胞サンプルから調製されることを特徴とする請求項2に記載の方法。

5. 前記赤外吸収データの検定／標準セットが、約100～約500の標準細胞サンプルから調製されることを特徴とする請求項2に記載の方法。

載の方法。

6. 前記赤外透過性マトリックスが、 $\text{BaF}_2$ 、 $\text{ZnS}$ 、ポリエチレンフィルム、 $\text{CsI}$ 、 $\text{KCl}$ 、 $\text{KBr}$ 、 $\text{CaF}_2$ 、 $\text{NaCl}$ 及び $\text{ZnSe}$ からなる群から選択されるメンバーから調製されるマトリックスであることを特徴とする請求項1に記載の方法。

7. ステップ (a) の前に、前記剥離した頸部細胞を分散し、それにより前記サンプル中の非診断的デブリスから前記頸部細胞を分離して、乾燥するための実質的に均一な細胞の懸濁液を供することを特徴とする請求項1に記載の方法。

8. 前記剥離した頸部細胞サンプルが保存溶液中に分散されることを特徴とする請求項7に記載の方法。

9. 前記比較が主成分分析を利用し、そして約 $1200\text{cm}^{-1}$ ～約 $1000\text{cm}^{-1}$ の周波数域に制限されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

10. 前記比較が主成分分析を利用し、そして約 $1250\sim 1000\text{cm}^{-1}$ 、約 $1420\sim 1330\text{cm}^{-1}$ 及び約 $3000\sim 2800\text{cm}^{-1}$ の周波数域の同時分析により行われることを特徴とする請求項1に記載の方法。

11. 前記中赤外光のビームが個々の細胞の大きさの孔を通してあてられ、そして前記乾燥細胞サンプルについての前記吸収データが単一細胞について作り出されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

12. ステップ (a) の前に、前記剥離した頸部細胞サンプルを保存溶液中に分散し、それにより前記サンプル内の非診断的デブリスから前記頸部細胞を分離して、乾燥するための細胞の実質的に均一な懸濁液を供し、そして前記中赤外光のビームを個々の細胞の大きさの孔を通してあて、そして前記乾燥細胞サンプルについての前記吸収データを単一細胞について作り出すことを特徴とする請求項1に記載の方法。

13. ホストにおいて悪性及び前悪性の頸部の状態を同定するための方法であって、

(a) 前記ホスト中の頸部細胞に光ファイバーを通して赤外光のビームをあてて前記細胞についての吸収データを作り出すステップと、

(b) 前記細胞についての前記吸収データを赤外吸収データの検定／標準セットと比較して、前記悪性又は前悪性状態の特徴である赤外吸収の変化が、少なくとも1の周波数の範囲において前記頸部細胞内でおこるか否かを決定するステップであって、前記比較が部分最小二乗法又は主成分分析統計法を利用し、それにより前記悪性又は前悪性状態の同定を行うステップと、

を含む方法。

14. 前記頸部細胞からの赤外吸収データの検定／標準セットを、正常、形成異常及び悪性の個体の典型的集団から調製することを特徴とする請求項13に記載の方法。

15. 前記吸収データが誘導化されておらずかつ平滑化されていないことを特徴とする請求項13に記載の方法。

16. 形成異常の高い危険性を有する患者を同定するための方法であって、

(a) サンプルの各々がソース又はパターンのいずれかにおいて互いに異なる少なくとも1の第1のスペクトルパターン及び少なくとも1の第2のスペクトルパターンを示す細胞の組合せを有する形成異常の経歴のない女性からとった頸部細胞からの吸収スペクトルの標準セットを作り出すステップと、

(b) 頸部細胞サンプルについての吸収データを作り出すステップと、

(c) 該吸収データを前記標準スペクトルと比較することにより前記形成異常についての高い危険性の同定を行うステップと、

を含む方法。

17. 前記少なくとも1の第1及び第2のスペクトルパターンが、パターンI、パターンII並びにパターンI及びパターンIIの線形的組合せからなる群から選択されることを特徴とする請求項16に記載の方法。

18. 前記スペクトル及び前記吸収データが、赤外、核磁気共鳴、フローサイトメトリー、及び紫外分光法からなる群から選択される分光法によって得られることを特徴とする請求項16に記載の方法。

19. 細胞サンプルと標準細胞サンプルとの間の化学的差を検出するための赤外顕微分光法であって、

(a) 前記細胞サンプル中の個々の細胞に赤外光のビームをあてて前記個々の細胞についての吸収データを作り出すステップと、

(b) 該個々の細胞についての吸収データを、少なくとも1の標準細胞サンプルから得た赤外吸収スペクトルと比較して比較データを作り出すステップと、

(c) 該比較データの多変量分析を利用して該比較データについての予測スコ

アを作り出すステップと、

(d) 該予測スコアからの度数分布プロフィールを作り、それにより前記化学的差の赤外顕微分光検出を行うステップと、

を含む方法。

20. 前記細胞サンプルが剥離した頸部細胞を含むことを特徴とする請求項19に記載の方法。

21. 前記多変量分析が、部分最小二乗(PLS)、主成分回帰(PCR)及び主成分分析(PCA)からなる群から選択される1又は複数の技術を含むことを特徴とする請求項19に記載の方法。

22. 前記細胞サンプルから得た赤外吸収データ及び前記標準細胞サンプルからの赤外吸収スペクトルを、 $1200\text{cm}^{-1}$ ～ $1000\text{cm}^{-1}$ 及び $3000\text{cm}^{-1}$ ～ $2800\text{cm}^{-1}$ からなる群から選択される1又は複数の周波数域で比較することを特徴とする請求項19に記載の方法。

23. 正常、前悪性及び悪性細胞間を区別するための赤外顕微分光法であって、

(a) 前記細胞サンプル中の個々の細胞に赤外光のビームをあてて前記個々の細胞についての吸収データを作り出すステップと、

(b) 前記吸収データを、少なくとも1の正常、悪性又は前悪性であると細胞学的に決定されている標準細胞サンプルから得た赤外吸収スペクトルと比較して、比較データを作り出すステップと、

(c) 該比較データの多変量分析を利用して該比較データについての予測スコアを作り出すステップと、

(d) 該予測スコアからの度数分布プロフィールを作り、それにより正常、前悪性及び悪性細胞からなる群から選択される個々の細胞が赤外顕微分光法により区別され得るステップと、

を含む方法。

24. 前記細胞サンプルが剥離した頸部細胞を含むことを特徴とする請求項23に記載の方法。

25. 前記赤外吸収データの検定／標準セットが、ソース又はスペクトルバター

ンのいずれかで互いに異なり、そしてパターンI及びパターンIIからなる群から独立して選択されるスペクトルパターンに各々相当する第1のIRスペクトル及び第2のIRスペクトルを含み、そして該第1のIRスペクトル及び第2のIRスペクトルが、正常、正常-形成異常、形成異常及び悪性細胞からなる群から独立して選択される細胞から得られることを特徴とする請求項24に記載の方法。

26. 細胞サンプルと標準細胞サンプルとの間の化学的差を検出するための赤外イメージング法であって、

(a) 前記細胞サンプルに赤外光のビームをあてて前記細胞サンプルについての吸収データを作り出すステップと、

(b) 該吸収データを、少なくとも1の標準細胞サンプルから得た赤外吸収スペクトルのピクセルごとの分析により作製された吸収スペクトルの検定/標準セットと比較して比較データを作り出すステップと、

(c) 該比較データの多変量分析を利用して該比較データについての予測スコアを作り出すステップと、

(d) 該予測スコアからの度数分布プロフィールを作り、それにより前記化学的差の検出を行うステップと、

を含む方法。

27. 前記細胞サンプルが剥離した頸部細胞を含むことを特徴とする請求項26に記載の方法。

28. 前記赤外光のビームが、約 $3000\text{cm}^{-1}$ ～約 $950\text{cm}^{-1}$ 及び約 $4000\text{cm}^{-1}$ ～約 $1200\text{cm}^{-1}$ からなる群から選択される周波数の光であることを特徴とする請求項26に記載の方法。

29. 細胞サンプル中の正常、前悪性及び悪性細胞間を区別するための赤外イメージング法であって、

(a) 前記細胞サンプルに赤外光のビームをあてて前記細胞サンプルについての吸収データを作り出すステップと、

(b) 前記吸収データを、正常、悪性又は前悪性であると細胞学的に決定されている細胞からなる群から選択される1又は複数の細胞型から得た赤外吸収スベ

クトルのピクセルごとの分析により作製された赤外吸収スペクトルの検定標準セットと比較して、比較データを作り出すステップと、

(c) 該比較データの多変量分析を利用して該比較データについての予測スコアを作り出すステップと、

(d) 該予測スコアからの度数分布プロフィールを作り、それにより正常、前悪性及び悪性細胞が区別されるステップと、

を含む方法。

30. 前記細胞サンプルが剥離した頸部細胞を含むことを特徴とする請求項29に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

フーリエ変換赤外分光法を用いて細胞の異常を検出するための方法

## 発明の背景

パパニコラウススミア (Pap スミア) による前悪性の及び悪性の細胞の検出は、頸部の癌による高い死亡率を大きく削減している。しかしながら、Pap スクリーニング過程は労力が激しく、約50年前にPapanicolausにより最初に記載されてから本質的に変わっていない。テストを行うために、細胞は、スパチュラ又はブラシを用いてこすり落とすことにより患者の頸部から剥離される。次にそのすり落としたものをスライド上に塗り、そのスライドを染色して顕微鏡で検査する。顕微鏡での検査は単調で退屈な過程であり、標品中のしばしばいくつかの異常細胞を検出するためにスライド内の全ての場所を視覚的に細かく調べるために細胞検査技師を必要とする。結果として、異常な標品の検出は細胞検査技師の経験及び作業負荷のレベルに、及びスミア調製の質にもよる。

Pap スミアの現在の重要な研究は、現在の技術に関連する誤差率が驚くべき高さであり得ることを報告した。例えば、その報告された誤った陰性率 (センシティブティー) は6%~55%の範囲である (Shingleton, H. M., ら CA Cancer J. Clin., 45: 305~320(1995)を参照のこと)。

これらの懸念の結果として、Pap スクリーニング過程を自動化し、及び染色過程を標準化するための試みが行われた。検査する頸部をこすり取ったものの中の血液、粘液及び他の非診断的デブリスの成分を最小にすることにより、Pap スミアの診断結果を改善するために特定の利用できる自動化システムがデザインされた。これらの

変化及びサンプルの結果の単純化にかかわらず、Pap スミアの診断は本来的な偏りによりかなり影響を受け続けている。これにより、頸部の細胞内の化学的又は形態学的変化のような客観的な基準に基づくPap スミアを診断する代替りの手段を開発することに対して、現在、努力が払われている。

分子及び免疫学的技術を用いるものを含む細胞学的異常を検出するためのいくつかの方法が研究されている。新しい分子及び免疫学的方法の開発を支持する1



つのはずみはヒトパピローマウイルス(HPV)の検出である。特定のサブタイプのHPVは異常な障害の高い発生率に関連しており、頸部の癌の病因に関連する。これらの技術は特異的であり高い危険を伴って頸部試料を検出するが、それらは現在、コストがひどくかかり、極めて労力が激しい。

現在、細胞学的スクリーニングにより、136が正常であり、12が癌を有し、そして8が形成異常である156の頸部サンプルのフーリエ変換赤外(FT-IR)スペクトルにおいて差が報告されている(Wongら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 8140~8145 (1991)を参照のこと)。この研究はサンプル間を識別するために中位IR領域( $3000-950\text{ cm}^{-1}$ )の特徴に依存する。正常なサンプルのスペクトルは、グリコーゲンのためであり得る $1025\text{ cm}^{-1}$ の主要なピーク、並びに $1047\text{ cm}^{-1}$ ,  $1082\text{ cm}^{-1}$ ,  $1155\text{ cm}^{-1}$ 及び $1244\text{ cm}^{-1}$ の他のより顕著でないバンドを示した。癌と診断された試料のスペクトルは $1025\text{ cm}^{-1}$ 及び $1047\text{ cm}^{-1}$ におけるバンドの強度の大きな変化を示し、そして正常な試料において欠如する $970\text{ cm}^{-1}$ のピークを示した。癌のサンプルは $1082\text{ cm}^{-1}$ ,  $1155\text{ cm}^{-1}$ 及び $1244\text{ cm}^{-1}$ の通常現れるピークの大きなシフトも示した。形成異常として細胞学的に診断された頸部試料は、正常なものと悪性のものとの間の外観において中間のスペクトルを示した。これらの観察に基づいて、Wongらは、FT-IR分光法は、頸

部試料をスクリーニングするための信頼できかつコストに有効な代替りの方法を提供し得る。

Wongら(1991)のFT-IR顕微鏡研究は、正常なサンプルと悪性のサンプルとの間の差に主に焦点をあて、そしてほんのいくつかの形成異常試料を利用した。より重要なのは、試料間の識別は、スペクトルの視察により、及び特定の周波数におけるピーク強度比の明白な変化を視覚的に検出することにより行われた。識別の基礎としての視覚的視察は理想的な分析の方法ではない。この試みは主観的かたよりに弱く、頻繁に、スペクトル間の小さなバリエーションに鈍感である。悪性試料の場合、スペクトルパターンは正常のサンプルのそれと比べて著しく変わる。しかしながら、低グレードの形成異常(例えばCIN I-頸部上皮内新形成)の試料の大部分のスペクトルは正常なサンプルからのスペクトルと類似し、識別

するのが困難である。結果として、視覚的視察は頸部試料の分析のために信頼できずかつ適さない。

スペクトル間を識別するためにピーク強度比を選択する方法も問題を有する。この技術は全体的な形状及びパターンを同定し、先の試みのようにスペクトル間の微妙な差の検出において鋭敏さを欠く。この方法の他の欠点は、非診断的デブリスによって引き起こされ得る妨害のためのモデルとなり得ないこと、並びにサンプル調製及び取扱い技術から生じ得る誤差を含む。後者は別として、この方法は、ベースラインシフト、スペクトルの縞、サンプル中のバッチ間のバリエーションのための適切なモデルになり得ず、及び／又は分光光学装置から生じ得る非線形性及び赤外光の屈折散乱を説明できない。

更に最近、Wongらにより先に報告されたものより大きい形成異常の試料のスペクトルの多様性が報告された (Morris. ら、Gynecologic Oncology 56: 245~249(1995))。測定した25の試料のうち、低グレード形成異常 (CIN I) の9/13の試料のスペクトルが正常な試料のスペクトルに本質的に似ていた。しかしながら、形成異常が低いものから高いもの (CIN I から CIN III) へ進行するにつれて、正常なサンプルと形成異常のサンプルとの間のスペクトルの差の大きさは強まった。この差は、 $972\text{cm}^{-1}$  の特徴的なピーク、並びに  $1026\text{cm}^{-1}$  (減少)、 $1081\text{cm}^{-1}$  (増加及び高周波数にシフト)、 $1156\text{cm}^{-1}$  (減少及び平坦化)、及び  $1240\text{cm}^{-1}$  (増加) のバンドの強度の変化を示した高グレード形成異常 (CIN III) の試料で最も明らかであった。

形成異常の試料のスペクトルのより大きな多様性に焦点をあてた更に最近の研究 (Cohenford ら、Mikrochemica, Acta, 出版中) は、スペクトルの変化の程度が、頸部異常の異なる段階とおそらく関連し得ることを示した。例えば、Morris 及び共同研究費らが示したように、(Gynecologic Oncology, 56: 245~249(1995))、激しい形成異常 (CIN III) の試料のスペクトルが、正常と診断された試料のそれと、悪性細胞を含むとして診断されたそれとの間の中間である外観を有した。不幸なことに、弱い形成異常 (CIN I) を示す試料の IR スペクトルは本質的に正常な試料のスペクトルに本質的に似ていた。

悪性細胞への形成異常細胞の進行は十分に証明されているばかりでなく癌の早期診断及び予防において基本的に重要である。臨床的観点から平常な細胞のものから形成異常の細胞の試料を識別することが重要であるので、IR分光法を用いる一般的に役立つ方法は、このより細かい識別ができなければならない。全く驚くことに、本発明はこのような方法を提供する。

#### 発明の概要

本発明は、剥離した頸部細胞サンプルにおいて悪性及び前悪性の病状を早期検出し及び同定するための方法を提供する。本発明は、バルクIR分光法単細胞IR顕微分光法及びピクセルごとの分析を伴うIRイメージングにより、頸部細胞を収集し、分析することを含む。更に、本発明は、Pap細胞学により正常又は異常（例えば形成異常又は悪性）として分類される細胞の変化のための化学的な基礎を検出するための方法を提供する。この態様において、本発明は、バルク細胞サンプルのIR分光法、IR顕微分光法又はIRイメージングを利用することにより、病気の細胞のサンプルの化学的変化を検出するための方法を提供する。

本発明の第1の態様は、剥離した頸部細胞サンプルにおいて悪性又は前悪性の病状を同定するための方法を提供する。

本方法は、

(a) 赤外透過性マトリックス上に剥離した頸部細胞サンプルを乾燥させて乾燥細胞サンプルを作るステップと；

(b) 約3000～約950 $\text{cm}^{-1}$ の周波数を有する中赤外光のビームを前記乾燥細胞サンプルにあてて該乾燥細胞サンプルのための吸収データを作るステップと、

(c) 該乾燥細胞サンプルについての吸収データを赤外吸収データの検定／標準セットと比較して前記乾燥細胞サンプル中で、少なくとも1の周波数の範囲において、悪性又は前悪性状態の特徴である赤外吸収の変化がおこるか否かを決定するステップと、を含む。本比較の方法は、部分最小二乗(PLS)又は主成分分析(PCA)統計法を利用し、誘導化されずかつ平滑にされていない吸収データに基づく。

他の態様において、本発明は、ホストにおいて悪性又は前悪性の

頸部の状態を同定するための方法である。

本方法は、

(a) 特定範囲の周波数においてホスト内の頸部細胞に光ファイバーを通して赤外光のビームをあて、ホストの頸部細胞についての吸収データを作るステップと、

(b) 少なくとも1の範囲の周波数において頸部細胞内で赤外吸収の変化がおこるか否かを決定するために、赤外吸収データの検定／標準セットと前記頸部細胞についての吸収データを比較するステップであって、該比較が部分最小二乗又は主成分分析統計法を利用し、そして前記吸収データが誘導化されずかつ平滑化されず、それにより悪性又は前悪性状態の同定が行われるステップと、を含む。

他の態様において、本発明は、頸部の形成異常を進展させる高い危険性のある女性を分光法的に同定するための方法である。

本方法は、

(a) 形成異常の経歴のない女性からとった頸部細胞からの吸収スペクトルの標準セットであって、そのサンプルの各々がいずれのソース又はパターンにおいても互いに異なる少なくとも1の第1のスペクトルパターン及び少なくとも1の第2のスペクトルパターンを示す細胞の組合せを有する標準セットを形成するステップと、

(b) 頸部細胞サンプルについての吸収データをつくるステップと、

(c) 該吸収データを前記標準スペクトルと比較することにより、形成異常についての高い危険性の同定を行うステップと、

を含む。

他の態様において、本発明は、細胞サンプルと標準細胞サンプルとの間の化学的な差を検出するための赤外顕微分光法を提供する。

本方法は、

(a) 赤外光のビームを細胞サンプル中の個々の細胞にあてて該個々の細胞についての吸収データを作るステップと、

(b) 前記個々の細胞からの吸収データを、少なくとも1の標準細胞サンプルか

ら得た赤外吸収スペクトルと比較して比較データを作るステップと、

(c) 該比較データの多変量分析を利用することにより個々の細胞の比較データのための予測されるスコアを作るステップと、

(d) 該予測されたスコアからの周波数分布プロフィールを作ることにより化学的差の検出が行われるステップと、  
を含む。

関連する態様において、本発明は、細胞サンプル中の平常、前悪性及び悪性細胞間を識別するための赤外顕微技術である。

更に他の態様において、本発明は、細胞サンプルと標準細胞サンプルとの間の化学的差を検出するための赤外分光イメージング法を開示する。

本方法は、

(a) 赤外光のビームを細胞サンプルにあてて該細胞サンプルについての吸収データを作るステップと、

(b) 該吸収データを、少なくとも1の標準細胞サンプルから得た赤外吸収スペクトルのピクセルごとの分析によって作製された吸収スペクトルの検定／標準セットと比較するステップと、

(c) 前記比較データの多変量分析を利用して該比較データについての予測されるスコアを作るステップと、

(d) 該予測されたスコアからの周波数分布プロフィールを作ることにより化学的差の検出を行うステップと、  
を含む。

関連する態様において、本発明は、正常、前悪性及び悪性細胞サ

ンプル間を識別するための赤外イメージング法を提供する。

先の概説した赤外顕微分光及びFT-IRイメージング技法の好ましい実施形態において、赤外吸収データの検定／標準セットは、通常の及び／又は化学的異常型として（カテゴリー又は他の適切な手段により）同定された細胞サンプルの代表的セットから得られる。

赤外顕微分光法及び赤外イメージングを利用する本発明の先に概説した態様の

各々の特に好ましい実施形態において、赤外吸収データの検定／標準セットは、赤外透過性マトリックス上で乾燥した細胞学的に決定した正常、成形異常及び悪性頸部細胞の代表的セットから得られる。

検定／標準セット又は患者の細胞サンプルからとった吸収データを含むいずれかの吸収データから少なくとも1のバックグラウンドスペクトルを差し引くことは上述の態様及び本発明の実施形態の各々の範囲内である。その差し引いたスペクトルは明白な及び個々のパターンを有し得る。あるいは、その差し引いたスペクトルは、それらのソース、パターン又は強度において互いから異なる1超のスペクトルの線形的又は非線形的組合せからなり得る。

#### 図面の簡単な説明

図1は、通常の頸部の剥離物の中赤外スペクトル( $950\text{cm}^{-1}\sim 1300\text{cm}^{-1}$ )を示す。

図2は、悪性の頸部の剥離物の中赤外スペクトル( $950\text{cm}^{-1}\sim 1300\text{cm}^{-1}$ )を示す。

図3は、バルク中の正常サンプルのスコアの予測を示すヒストグラムである。

図4は、バルク中の悪性サンプルのスコアの予測を示すヒストグラムである。

図5は、鱗状上皮細胞の2つの集団の中赤外スペクトル( $950\text{cm}^{-1}\sim 1300\text{cm}^{-1}$ )を示す。

図6は、傍基底細胞及び頸管内細胞からの中赤外スペクトル( $950\text{cm}^{-1}\sim 1300\text{cm}^{-1}$ )の比較を示す。

図7は、形成異常細胞及び鱗状癌細胞からの中赤外スペクトル( $950\text{cm}^{-1}\sim 1300\text{cm}^{-1}$ )の比較を示す。

図8は、頸部スミアにおける個々の正常な細胞の2つの典型的な中赤外スペクトル( $1000\text{cm}^{-1}\sim 1300\text{cm}^{-1}$ )を示す。

図9は、正常なスミアにおける予測されるスコアのセットの代表のヒストグラムを示す。

図10は、検定セットIとの全てのスミアからのヒストグラム計算に基づく0.5カットオフインターバルにおける予測されるスコアの累積パーセンテージを要

約する。

図11は、検定セットIIとの全てのスミアからのヒストグラム計算に基づく 0.5 カットオフインターバルにおける予測されるスコアの累積パーセンテージを要約する。

図12は、検定セットIIIとの全てのスミアからのヒストグラム計算に基づく 0.5 カットオフインターバルにおける予測されるスコアの累積パーセンテージを要約する。

図13は、検定セットIVとの全てのスミアからのヒストグラム計算に基づく 0.5 カットオフインターバルにおける予測されるスコアの累積パーセンテージを要約する。

#### 発明の詳細な記載

##### 略語及び定義

本明細書に用いる略語は次の意味を有する；PCA、主成分分析；PCR、主成分回帰；PLS、部分最小二乗分析；PRESS；平方の予測

残存誤差和；FT-IR、フーリエ変換赤外分光法；SPIFF、スペクトルイメージファイル；FPA、焦点面アレイ；CIN 頸部上皮内新形成；HPV、ヒトパピローマウイルス。

本明細書に用いられる場合、用語“誘導化されない（非誘導化）”及び“平滑化されない（非平滑化）”とは、1）スペクトルの傾き又は傾きの変化を増強するため、及び2）スペクトルのランダムノイズを減少させるために算数的操作を適用しない方法をいうのに用いられる。用語“化学的差”とは、癌のような病状に関連する細胞化学の変化をいう。これらの“化学的差”は、正常な細胞のそれから変えられた細胞のミリューを生じ、この変化は赤外分光学によって検出できる。“予測スコア”は、異なるダミー変数を標準／検定スペクトルの周知のカテゴリに入る細胞のスペクトル（例えば、正常、正常-形成異常、形成異常、悪性等として同定される細胞に関連するスペクトル）に割り当てることによって形成される。予測スコアは、赤外スペクトルが種々の周知の標準／検定スペクトルのカテゴリにいかにも似ているかを示す。“周波数分布プロフィール”は、各々

の生物試料についての予測スコアの頻度の表である。“正常”である細胞サンプルは、以前に病気の経歴のない患者から得たものである。“正常-形成異常細胞”は、Pap細胞学で正常であるが、形成異常の経歴を有する患者から得たものである。“赤外光”という表現は、電磁スペクトルの赤外領域におけるエネルギーを含むことを意図する。最後に、本明細書全体を通して、用語“スペクトル”及び“吸収データ”は、交換可能に用いられる。これらの用語のいずれもが、分光法測定（例えば自由誘導減衰(FID)）により得られた生のデータ、完全に処理したスペクトル又はスムージング又は誘導化のような更なる操作が行われたスペクトルを示し得ることが理解される。

#### 実施形態の記載

微妙な変化を有する頸部試料のスペクトル間の識別は、強力かつセンシティブな分析方法の使用を要求する。これらの方法は、種々の原因により生じ得る非線形性のためのモデルとならなければならない。装置セッティングにおける日ごとの変化を考慮しなければならない。サンプル操作の誤差、スペクトルの縞、ベースラインシフト、バッチ間の変化、非診断的デブリスの存在及び識別に悪影響を与える全ての他の因子も適切に考慮されモデル化されなければならない。水は中赤外領域において強く吸収し、いくつかの周波数において強度の変化に寄与する。これにより、分析の方法は、頸部試料中の種々の水分の量も考慮しなければならない。最後に、方法が強力なものであるために、それは優れた質のスペクトルと悪い質のスペクトルとの間を識別し、そして検定の代表でないサンプルを排除しなければならない。その代表でないサンプルはアウト라이어サンプルとして言及される。アウト라이어サンプルは、検定セットにおいて全ての他のサンプルと統計的に異なるサンプルである。頸部剥離物の場合、アウトライアースペクトルは、細胞の最適数より少ないサンプル、及び／又は血液、粘液及び／又は非診断的デブリスが豊富である試料から生じ得る。

第1の態様において、本発明は、剥離された頸部細胞サンプル中の悪性又は前悪性状態の同定のための方法を提供する。

本方法は、



(a) 赤外透過性マトリックス上に剥離した頸部細胞サンプルを乾燥させて乾燥細胞サンプルを作るステップと；

(b) 約3000～約950 $\text{cm}^{-1}$ の周波数を有する中赤外光のビームを前記乾燥細胞サンプルにあてて該乾燥細胞サンプルのための吸収データを作るステップと、

(c) 該乾燥細胞サンプルについての赤外吸収データを赤外吸収データの検定／標準セットと比較して前記乾燥細胞サンプル中で、少なくとも1の周波数の範囲において、悪性又は前悪性状態の特徴である赤外吸収の変化がおこるか否かを決定するステップと、を含む。本比較の方法は、部分最小二乗(PLS)又は主成分分析(PCA)統計法を利用する。更に、吸収データは、誘導化されずかつ平滑にされていない。

この方法において、赤外吸収データの検定／標準セットは、正常、形成異常又は悪性サンプルとしてPap カテゴリーにより以前に同定されている細胞サンプルから得られる。これらの細胞型の同定は、典型的には、スミア上で行われるもののような細胞学的検査によって行われる。同定された細胞型の各々についての赤外吸収スペクトルは、約3000 $\text{cm}^{-1}$ ～約950 $\text{cm}^{-1}$ の中赤外領域について得られる。典型的には、赤外吸収データの検定／標準セットは、約100～約1000の標準細胞サンプル、好ましくは約100～約500の標準細胞サンプルから調製される。

一般に、検定セットは、スペクトルにおいて、全ての予想されるバリエーションの代表であるべきである。次に、全てのサンプルの赤外吸収データは、PCA又はPLSアルゴリズムを利用するコンピューターで処理されて検定スペクトル内の各々のバリエーションに関する情報を抽出する。その後、異なる群の頸部試料（例えば正常、形成異常又は悪性）間を区別するために、その結果として生ずる情報が用いられる。

剥離された頸部細胞サンプルは、Papスクリーニングのための収集サンプルに用いられるもののような普通の方法によって収集され、赤外透過性マトリックスに適用される。本発明に用いるために種々のマトリックスが利用できる。中赤外研究のための好ましいマト

リックスはBaF<sub>2</sub>, ZnS, ポリエチレンフィルム、CsI, KCl, KBr, CaF<sub>2</sub>, NaCl 及びZnSeである。特に好ましいマトリックスはZnS である。サンプルをマトリックスに適用した後、そのサンプルは、赤外スペクトルを妨害する水分を除去するために乾燥させられる。乾燥させるために用いられる方法は、典型的には、周囲温度で空気乾燥することを含む。あるいは、サンプルは、制御されたゆっくりとした加熱と共に、及びサンプルを通しての空気又は不活性ガスの流れを通すことにより、乾燥させることができる。例えば、適用されたサンプルを含むマトリックスは、30℃～35℃（例えば約30～35℃の温度制御ノブを有するホットプレート）におくことができ、そして例えば空気、窒素又はアルゴンの雰囲気、それらの乾燥を促進するためにサンプル上に通過させることができる。

米国特許第 4,980,551号に記載されるサンプルホルダーが利用される。要するに、その装置は、面と面との接触部に1セットのIR透過性窓が適合するように作られ、赤外光ビーム透過通路の経路内でその窓を固定するための手段を含む。少なくとも1の窓の外部は、その窓の間にサンプルのための空間を供するようかたどられた表面部分を有する。隣接する異なる長さのビーム経路を供するように成形されたこのサンプル空間は、光学的干渉を最少にし、スペクトルの質を上げる。ホルダーを利用するために、頸部剥離物からの成分は、窓の1方のサンプル空間内に最初におかれる。他の窓を注意深く試料上におくと共に、窓を固定するようホルダーをしめる。赤外光はそのサンプル空間を通過し、頸部サンプルの吸収が記録される。この技術による頸部試料のスペクトルの獲得は困難かつ時間を浪費する過程である。例えば、それは、特別の窓が作られるばかりでなく生物試料が2つの窓の間で圧縮される間、妨害されないようでなければならない。圧縮は、頻繁に組織流体の漏出を引き起こし

、最後には窓の領域をこえて頸部試料がこぼれる。更に、頸部試料はAIDS、ヘルペス及び／又は種々の肝炎ウイルスのような感染体で汚染され得るので、いずれの漏出も深刻な生物学的安全性の問題を作り出す。なお更に、組織流体は中赤外領域において強く吸収し、いくつかの周波数において強度の変化を引き起こす。

対照的に、本発明の方法は、操作するのが容易でありそして高い質のスペクト

ルを供するサンプルを生ずる。より重要なのは、乾燥することが組織流体に関連する問題を排除し、そして感染体による汚染の危険を減らすことである。この方法によって処理される100を超える頸部剥離物の研究において、直接的析出及び試料の乾燥が最少の縞を有する又は縞のないスペクトルを供することが見いだされた。

頸部スミア中の細胞の凝集は一般的な問題であり、診断を複雑にする。頸部の剥離物の完全な分散は周囲の非診断的デブリス及び粘液からの細胞の分離を引きおこし、スペクトルを得るための細胞の比較的均一な懸濁液を供し、そして異常細胞を検出する可能性を増加させる。

これにより、特定の実施形態において、それらの赤外マトリックスへの適用の前に分散されよう。細胞サンプルの分散は、好ましくは剥離した細胞の一体性を維持する保存液中で行われる。保存液についての選択基準は、保存液が直ちにエバポレートし、そしてエバポレーションに基いて、頸部剥離物の赤外スペクトルにおいて妨害となる残留物を残さないことも必要とする。このような保存液の例

は P. R. ESERV CYT® (CYTYC Corporation, Marlborough, Massachusetts, USA) である。細胞サンプルの分散の後、その混合物は非診断的デブリスを除去するためにろ過され、そしてその細胞の溶液は上述のように均一層において赤外マトリックスに適用され、乾燥さ

れる。

サンプルを赤外マトリックス上に調製し（そして乾燥）た後、中赤外光のビームがサンプルにあてられ、そしてそのサンプルの吸収が、いくつかの市販の赤外分光光度計のいずれかをを用いてモニターされる。好ましくは、その分光計はDTGSディテクターを備えた Bio-Rad Digilab FTS 165 分光計である。他の適切な分光計は当業者に周知である。スペクトルは約  $2\text{ cm}^{-1}$  ~ 約  $10\text{ cm}^{-1}$ 、好ましくは約  $4\text{ cm}^{-1}$  ~ 約  $8\text{ cm}^{-1}$  の分解能で収集される。更に、いくつかのスキャンが行われ、同時に加算される。好ましくは、約 50 ~ 500 のスキャンが同時に加算され、より好ましくは 100 ~ 300 のスキャンが同時に加算される。好ましい実施形態において、周波数域  $3000\text{ cm}^{-1}$  ~  $1000\text{ cm}^{-1}$  において最少吸光度 0.0 及び最大吸光度 1.0 にセ

ットすることによりスペクトルは標準化される。

乾燥細胞サンプルについての赤外吸収データの収集の後、悪性又は前悪性状態の特徴である変化がスペクトル中に存在するか否かを決定するために、そのデータは検定／標準セットと比較される。この比較を行ういくつかの手段を用いることができる。本発明の好ましい態様において、多変量分析が用いられる。

多変量分析は、生物サンプルを分析するのに用いられており、頸部スミアからのスペクトルを分析するための有望な方法である。例えば、米国特許第 4,975,581 (1990年12月4日発行) においてRobinsonらは、多変量分析を用いて、周知の生物流体中の生物被検体の類似性を決定するための定量的方法を記載する。本発明と対照的に、Robinsonらは、流体内の被検体の生体内評価に焦点をあて、非侵襲的技術を用いる。哺乳動物細胞のような固体生物材料間を識別するため、及び体の外側の経路の長さの変化で固体生物材料のIRスペクトルを識別する間に生じ得る問題に取り組むためには便宜ははか

られていない。

主成分分析(PCA)及び識別分析は、現在、正常な及び異常な頸部剥離物の間を識別するために用いられている。Zhengfang ら、Applied Spectroscopy 49 : 432~436 (1995)を参照のこと。しかしながら、それに記載される方法は、前悪性段階の頸部癌の検出にも焦点をあてておらず、頸部試料からの妨害性及び非診断性材料の除去にもよらない。更に、Zhengfang らは、スペクトルを平滑化する処理アルゴリズムによっている。スペクトルのスムージングは、スペクトルパターン間に存在する微妙な差をわかりにくくすることがあり、結果として、識別分析に影響を与え得る。

種々の科学の分野及び多くのタイプの適用においてPCR 及びPLS が用いられているが、これらの技術は、スペクトルの中赤外領域において、正常な患者及び形成異常又は頸部癌を有する患者からの頸部剥離物を識別するのに用いられていない。PCR 及びPLS の両方は、大量のデータを、分析のために直ちに処理することができるセットに減らすことができる。より重要なのは、哺乳動物細胞のスペクトルを評価するためにこれらの方法が用いられる場合、その技術はスペクトルの

全体の領域を分析し、異なる群の試料のスペクトル間の識別を許容する。

本発明の第1の態様バルク細胞サンプルのIR分光法において、吸収データの比較は、好ましくは非平滑化及び非誘導化のデータに基づく部分最小二乗(PLS)又は主成分分析(PCA)によって典型的に行われる。しかしながら、赤外顕微分光法又は赤外イメージングを利用する態様において、これが要求されると思われるなら、分析の前に平滑化及び／又は誘導化が行われ得る。好ましくは、主成分回帰(PCR)を用いる比較にPCAを用いて行われる。(Bio-Rad, Cambridge, Massachusetts, USAからの) PCR-32®並びに(Galactic Industries, Salem, New Hampshire, USAからの) PLS-PLUS®及びDIS CRIMINATE®を含むこれらの統計法を行ういくつかのコンピュータプログラムが利用できる。基礎となる理論及び計算の議論は、例えば、Haalandら、Anal. Chem. 60:1193~1202(1988); Cahnら、Applied Spectroscopy, 42:865~872(1988); 及びMartensら、MULTIVARIATE CALIBRATION, John Wiley及びSons, New York, New York(1989)に見い出される。PCR及びPLSの両方は、標準/検定セットを作るための標準材料からの同じ条件下で得られたスペクトルのライブラリーを用いる。これらのスペクトルは、同じ実験条件下で得られる。これらの技術は、スペクトルデータ圧縮(PCRの場合、このステップはPCAとして知られる)及び線形回帰からなる。因子又は主成分の線形的組合せを用いて、再構成されたスペクトルが得られる。その再構成されたスペクトルは、分類のための基礎として機能する未知の試料のスペクトルと比較される。

ge, Massachusetts, USAからの) PCR-32®並びに(Galactic Ind

ustries, Salem, New Hampshire, USAからの) PLS-PLUS®及び D

IS CRIMINATE®を含むこれらの統計法を行ういくつかのコンピュー

タープログラムが利用できる。基礎となる理論及び計算の議論は、例えば、Haalandら、Anal. Chem. 60:1193~1202(1988); Cahnら、Applied Spectroscopy, 42:865~872(1988); 及びMartensら、MULTIVARIATE CALIBRATION, John Wiley及びSons, New York, New York(1989)に見い出される。PCR及びPLSの両方は、標準/検定セットを作るための標準材料からの同じ条件下で得られたスペクトルのライブラリーを用いる。これらのスペクトルは、同じ実験条件下で得られる。これらの技術は、スペクトルデータ圧縮(PCRの場合、このステップはPCAとして知られる)及び線形回帰からなる。因子又は主成分の線形的組合せを用いて、再構成されたスペクトルが得られる。その再構成されたスペクトルは、分類のための基礎として機能する未知の試料のスペクトルと比較される。

未知のサンプルの分析の前に、同じ材料のスペクトルの他のセットが、検定を確認し、それを最適化するのに典型的に用いられる。このスペクトルの第2のセットは、モデルのランクを決定することによりPCR又はPLSモデルの予測精度を増加させる。PCR又はPLS予測値を周知の診断と比較することにより、特定範囲のランクから最適のランクが決定される。最適であると決定されたものからのランクを増加又は減少させることは、PLS又はPCR予測値に逆影響を与えることがある。例えば、そのランクが最適値から副次的最適値に次第に減少するにつれ、PCR又はPLSは、その検定スペクトルにおける変化が次第に小さくなる。対照的に、最適であると決定されたものを超えるランクへ次第に増加することは、検定

スペクトル中の重要な情報よりむしろ、PCR 又はPLS 法をランダムな変化にモデル形成するであろう。

一般に、標準セットがより多くのスペクトルを含むなら、モデルはより良質になり、そしてバッチ間の変化、ベースラインシフト並びに装置の移動及び回折示数の変化により生じ得る非線形性を克服する機会が多くなる。貧弱なサンプルの取扱い及び調製、サンプル不純物、並びに作業者の誤りによる誤差も、標準データが未知のサンプルを本当に示す限り克服され得る。

PCR 及びPLS 分析を用いる他の主な利点は、これらの方法が、検定スペクトルに対する未知のサンプルのスペクトルのノイズレベルを測定することである。生物サンプルは多数の振動のソースにさらされる。これらの振動のいくつかは、スペクトルの質に劇的に影響を与え、“診断”の結果に悪影響を与える。結果として、検定スペクトルに適合したスペクトルとそうでないものとの間を識別するのは避けられない。F比は、スペクトル(サンプル)の、検定スペクトルへの適合の一致度又は欠如を検出することにおける強力な道具である。一般に、検定のそれよりかなり大きいF比は“適合の欠如”を示し、分析から排除されるべきである。アウトライアーサンプルを排除する能力は、それが赤外及びよごれたスペクトルからの“診断”の形成を避けるので、PCR 又はPLS の強力さ及び信頼性を増す。F比は、Haaland ら、Anal. Chem. 60:1193~1202 (1988) 及びCahnら、Applied Spectroscopy 42 : 865~872(1988)に記載される方法によって計算することができる。

異なる頭部剥離物のサンプル間を識別する場合、生物材料はもはや周知の構成物の濃度、及び／又は一定の経路の長さを有する。結果として、検定スペクトルは、サンプルがその検定のメンバーとして分離されるのを許容する特定範囲の変化を決定しなければならず、経路長の多様性を克服するための処理アルゴリズムも含むべきである。頭部試料の識別の助けとなる1つの標準化の試みは、最大及

び最小点にスペクトル領域を位置させ、そして(例えば $3000\text{cm}^{-1}$ ~ $1000\text{cm}^{-1}$ の間の領域において)最少が0.0 最大が1.0 の吸光度となるようにスペクトルを再ス

ケールすることである。他の標準化手順は、IRスペクトルの特定の周波数において特定のピークを選択することであり、その選択されたピークに対する全ての他のピークに関する。標準化の第3のタイプは処理する前に吸光度ベクトルの振幅を標準化することである。

好ましい実施態様において、サンプルについての赤外吸収データ及び検定／標準セットについてのデータの比較は、周波数域 $1200\text{cm}^{-1}\sim 1000\text{cm}^{-1}$ 、より好ましくは、周波数域 $1250\text{cm}^{-1}\sim 1000\text{cm}^{-1}$ 、約 $1420\text{cm}^{-1}\sim 1330\text{cm}^{-1}$ 及び約 $3000\text{cm}^{-1}\sim 2800\text{cm}^{-1}$ において主成分分析を利用する。

Pap スクリーニング過程は、頸部剥離物中の各々の細胞の顕微鏡検査に基づく診断にする。しかしながら、本分光分析技術は、頸部剥離物のバルク分析を用いた。 $10\mu\text{m}$ に近い大きさの対象物を検査することができるフーリエ変換IR (FT-IR) 分光法の使用は、頸部剥離物中の血液、粘液、及び非診断的デブリスにより複雑になる。これらの材料は、細胞の凝集を引き起こし、細胞の実際のスペクトルを全体的におおいかくす妨害も作り出す。しかしながら、正常な試料と異常な試料との間のスペクトルの変化を引き起こすこれらの細胞を排他的に同定することが重要であり続けている。これにより、一群の実施形態において、本方法は、個々の細胞の大きさの孔を通してあてられる中赤外光のビームを用いて行われ、それにより単一細胞についての吸収データを供する。この実施例の群において、サンプルは上述のように分散される過されて、赤外マトリックスに適用し、乾燥させることができる細胞の均一な懸濁液を作り出す。

更なる態様において、本発明は、ホストにおける悪性又は前悪性

の頸部の状態を生体内で同定するための方法であって、

(a) 特定範囲の周波数においてホスト内の頸部細胞に光ファイバーを通して赤外光のビームをあて、ホストの頸部細胞についての吸収データを作るステップと、

(b) 少なくとも1の範囲の周波数において悪性又は前悪性の状態の特徴である頸部細胞内での赤外吸収の変化がおこるか否かを決定するために、赤外吸収データの検定／標準セットと前記頸部細胞についての吸収データを比較するステップ

であって、該比較が部分最小二乗又は主成分分析統計法を利用し、そして前記吸収データが誘導化されずかつ平滑化されず、それにより悪性又は前悪性状態の同定が行われるステップと、を含む方法を提供する。

好ましい実施形態において、頸部細胞からの赤外吸収データの検定／標準セットは、これらに限定されないが形成異常及び癌を含む頸部の種々の程度の状態を有する女性の代表的グループから得られる。

中赤外領域においては、 $3000\text{cm}^{-1}\sim 950\text{cm}^{-1}$ の間の周波数の使用が好ましい。近IRにおいては、 $12,500\text{cm}^{-1}\sim 4000\text{cm}^{-1}$ の間の周波数の使用が好ましい。

本発明のこの態様に用いられる技術は、一般に上述のものと同じである。データの生体内収集の基本的試みにおいて及び中又は近赤外光のビームをあてるための光ファイバーの使用において差がある。中赤外に用いられる典型的な光ファイバーは、Chalcogenide及びSilver Halideを含む。近IRのための典型的な光ファイバーはQuartzファイバーである。頸部細胞の生体内分析の1つの利点は、その方法が、医師を異常組織の部位に集中させ、バイオプシーのための試料の大きさも最少にすることである。更に、この方法は、患者が病院において検査される間、患者の迅速な目的のスクリーニングを

供し得る。本手順は、それらが細胞技術師により染色され評価される場合、研究室にPap スミアを送ることを必要とする。生体内技術の他の利益は、赤外分光法による局所限定の後の疑わしい組織の部位上の治療を含む。

他の態様において、本発明は、形成異常についての高い危険性のある患者を同定するための方法である。

本方法は、

(a) 形成異常の経歴のない女性からとった頸部細胞からの吸収スペクトルの標準セットであって、そのサンプルの各々がいずれのソース又はパターンにおいても互いに異なる少なくとも1の第1のスペクトルパターン及び少なくとも1の第2のスペクトルパターンを示す細胞の組合せを有する標準セットを形成するステップと、

(b) 頸部細胞サンプルについての吸収データをつくるステップと、



(c) 該吸収データを前記標準スペクトルと比較することにより、形成異常についての高い危険性の同定を行うステップと、

を含む。

先に述べたサンプル調製の技術は、本発明の態様と合わせて用いることができる。更に、研究下のサンプルは、乾燥した細胞サンプルであり得、又は乾燥されていないサンプルであり得る。特定の好ましい実施形態において、サンプル及び標準スペクトルを形成するのに用いられる分光分析技術は、赤外分光法、核磁気共鳴分光法、紫外分光法、及びフローサイトメトリーからなる群から選択される。他の好ましい実施形態において、標準セットにおける細胞の表現型は、Pap 細胞学によって決定される。更に他の好ましい実施形態において、本方法は、第1及び第2のスペクトルパターンを形成する赤外分光法を用いる。

赤外分光法を利用する本発明の実施形態において、吸収スペクトルの標準セットは、パターンI及びパターンII（各々図8A及び8B）として定義されるもの並びにパターンI及びパターンIIの線形的組合せに相当するパターンを伴う赤外スペクトルから選択される。パターンIは、約 $1025\text{cm}^{-1}$ の最大吸収並びに約 $1080\text{cm}^{-1}$ 、 $1160\text{cm}^{-1}$ 及び約 $1250\text{cm}^{-1}$ の広いピークにピークがある更なる別個のバンドによって区別される。パターンIIスペクトルは、 $1025\text{cm}^{-1}$ のピークの振幅並びに $1080\text{cm}^{-1}$ 及び $1250\text{cm}^{-1}$ のピークの広がり大きな減少を特徴とする。パターンI及びパターンIIスペクトルの線形的組合せは、これらの2つのスペクトルパターンのハイブリッドとして現れる。

中赤外光を用いるこの態様の実施形態においては、 $3000\text{cm}^{-1}\sim 950\text{cm}^{-1}$ の間の周波数の使用が好ましい。近IRにおいては、 $12,500\text{cm}^{-1}\sim 4000\text{cm}^{-1}$ の間の周波数の使用が好ましい。

更なる態様において、本発明は、細胞サンプルと標準細胞サンプルとの間の化学的な差を検出するためのFT-IR顕微分光法を提供する。

本方法は、

(a) 赤外光のビームを細胞サンプル中の個々の細胞にあてて該個々の細胞についての吸収データを作るステップと、

(b) 前記個々の細胞からの吸収データを、少なくとも1の標準細胞サンプルから得た赤外吸収スペクトルと比較して比較データを作るステップと、

(c) 該比較データの多変量分析を利用することにより個々の細胞の比較データのための予測されるスコアを作るステップと、

(d) 該予測されたスコアからの周波数分布プロフィールを作ることにより化学的差の検出を行うステップと、

を含む。

本発明の上述の態様の好ましい実施形態において、赤外光のビームは、約3000  $\text{cm}^{-1}$  ~ 約950  $\text{cm}^{-1}$ 、又は約12,500  $\text{cm}^{-1}$  ~ 約3000  $\text{cm}^{-1}$ の周波数を有する。他の好ましい実施形態において、前記化学的差は悪性又は前悪性表現型に関連する。更なる好ましい実施形態において、前記細胞サンプルは、膀胱、胸、男性又は女性生殖系（例えば前立腺、精巣、卵巣、子宮等）、中枢神経系、血液、肝臓、骨、結腸、脾臓又は他の器官又は構造からとった細胞を含む。特定の最も好ましい実施形態において、細胞サンプルは頸部細胞を含み、本発明の方法は、正常、正常形成異常、形成異常及び悪性表現型の間を識別するために利用される。更なる好ましい実施形態において、細胞サンプルから得たデータ及び標準サンプルから得たスペクトルは、1200  $\text{cm}^{-1}$  ~ 1000  $\text{cm}^{-1}$ 、より好ましくは約1250  $\text{cm}^{-1}$  ~ 1000  $\text{cm}^{-1}$ 、約1420  $\text{cm}^{-1}$  ~ 1330  $\text{cm}^{-1}$ 及び約3000  $\text{cm}^{-1}$  ~ 2800  $\text{cm}^{-1}$ の周波数域からなる群から選択される1又は複数の周波数範囲で比較される。なお更に好ましい実施形態において、データの多変量分析は、PLS、PCR及びPCA からなる群から選択される1又は複数の技術を用いることができる。

以下の議論において、頸部細胞サンプルは代表例として利用される。更に、明快さの目的のため、平常、悪性及び種々の形成異常細胞が議論される。本発明の方法が特定範囲の細胞型及び病気に広く適用できることは当業者に明らかであろう。

本発明のこの態様に用いられるサンプル収集及び調製の技術は、上述のものと一般的に同じであり得る。更に、本発明のこの態様と合わせて役立つデータ処理の方法は、一般に、先に概説されるのと同様である。更に、標準セットを構成す

る赤外吸収データは、形成異常を進展させる高い危険性のある患者を同定するための方法に関

して先に議論されるのと同様であり得る。

サンプルが乾燥され又は乾燥されていない本発明の更なる態様が本発明の範囲内であることは当業者に認められよう。更に、近赤外領域の光を利用する本発明のこれらの実施形態において、ガラス、水晶又は $\text{CaF}_2$ から作られたもののようなこの領域に用いるのに適した材料から作られたサンプルホルダーは、本発明に考慮される。

赤外顕微分光法は、単一細胞化学分析のための役立つ技術である (Yang, D., J. Clin. Laser Med. Surg., 13: 55~59 (1995) を参照のこと)。バルク FT-IR 分光法と FT-IR 顕微分光法との間の根本的な差は、その手順の空間的選択性にある。バルク分光法においては、IR ビームは頸部剥離物、細胞の及び非細胞の全ての構成物に対してあてられ、そして Pap スミア中の非特異的構成物又は細胞はスペクトルを得るための標的とされ得る。結果として、バルク分光法においては、頸部剥離物において全ての構成物の平均スペクトルを示す。他方、顕微分光法において、IR ビームは、スミア内のいくつかの対照のいずれかに対してあてることができる。例えば、赤血球のみのスペクトルが要求されるなら、顕微鏡段階は、赤血球を IR ビームの経路に位置するように簡単に動かされる。対照を選択する能力に加えて、FT-IR 顕微分光法は、回折限界近くの大きさでの対象の研究を許容するセンシティブな方法でもある。結果として、この方法は、それが 7~12 ミクロンの停基底細胞もしくは頸管内細胞、又は 35~45 ミクロンの中間鱗状上皮細胞のいずれであるかの頸部細胞の各々の型のスペクトルを供し得る。

IR 顕微鏡分光法を利用して、細胞サンプルの化学変化を許容する個々の細胞の赤外スペクトルが検出されることを証明することができる。例えば、それは、正常な、形成異常の及び悪性の頸部剥離物間の識別を許容する頸部細胞剥離物中の個々の頸部細胞の赤外スベ

クトルである。より重要なのは、主成分分析 (PCA) 及び部分最小二乗 (PLS) により

行われる予測スコアに基づく個々の細胞のスペクトルの分散プロフィールを作製するために、技術が開発され、本明細書に記載されることである。あるいは、分散プロフィールを作製することは、PLS、PCR及びPCA からなる群から選択される1又は複数の技術に依存し得る。細胞サンプル中の正常な及び病気の細胞を診断するために分散プロフィールを用いることができる。例えば、頸部細胞サンプルから形成された分散プロフィールは、“正常な”スミア（即ち、細胞学的に正常であるとして診断され、形成異常の経歴のない女性からのスミア）及び“正常-形成異常”のスミア（即ち細胞学的に正常であるとして診断され、形成異常の過去の経歴がある女性からのスミア）における細胞のスペクトルの間の明らかな分離を示す。分散プロフィールは、病状内に関連する明らかな化学的変化の存在又は欠如に従って細胞が分類されることを許容する。

関連する態様において、本発明は、細胞サンプル中の正常な、前悪性の、及び悪性の細胞の間を識別するための赤外顕微分光法である。その技術及び本発明のこの態様の好ましい実施形態は、一般に、細胞サンプルと標準セットとの間の化学的差を検出するための上述されるのと一般的に同じである。本発明のこの態様の重要な特徴は、標準セットの細胞が、正常、悪性又は前悪性表現型に対応するよう細胞学的に決定されることである。1つの好ましい実施形態において、検定／標準セットは、互いにソース又はスペクトルパターンのいずれにも異なり、パターンI及びパターンIIからなる群から独立して選択されるスペクトルパターンに各々相当する表1のIRスペクトル及び第2のIRスペクトルを含み、そして該第1のIRスペクトル及び第2のIRスペクトルは、正常、正常-形成異常及び悪性細胞からなる群から独立して選択される細胞から得られる。

更なる態様において、本発明は、細胞サンプルと標準細胞サンプルとの間の化学的差を検出するための赤外イメージング法を開示する。

本方法は、

(a) 赤外光のビームを細胞サンプルにあてて該細胞サンプルについての吸収データを作るステップと、

(b) 該細胞サンプルからの吸収データを、少なくとも1の標準細胞サンプルか

ら得た赤外吸収スペクトルのピクセルごとの分析によって作製された吸収スペクトルの検定／標準セットと比較するステップと、

(c) 前記比較データの多変量分析を利用して該比較データについての予測されるスコアを作るステップと、

(d) 該予測されたスコアからの周波数分布プロフィールを作ることにより化学的差の検出を行うステップと、  
を含む。

本発明のこの態様の一実施形態において、細胞サンプルは、頸部細胞サンプル、好ましくは正常、正常-形成異常、形成異常及び悪性細胞を含む剥離されたものである。更に他の好ましい実施形態において、赤外光のビームは中赤外領域内であり、約 $3000\text{cm}^{-1}$ ～約 $950\text{cm}^{-1}$ の周波数を有する。更に好ましい実施形態において、赤外光のビームは近赤外領域内であり、約 $4000\text{cm}^{-1}$ ～約 $12000\text{cm}^{-1}$ の周波数を有する。特に好ましい実施形態において、赤外吸収データの検定／標準セットは、赤外透過性マトリックス上で乾燥させられた細胞学的に決定された正常、形成異常及び悪性頸部細胞の代表的なセットから得られる。

本発明のこの態様に用いられるサンプル調製の技術は、一般に、赤外顕微分光法と合わせて上述されるのと同じである。データを処

理するための方法も、そのデータがピクセルごとに分析されることを顕著に除いて先に概説されるのと全体的に同様である。

本発明の関連する方法において、正常、形成異常及び悪性である細胞サンプル間を区別するために赤外イメージングが用いられる。本発明のこの態様において、標準細胞の表現型は細胞学的に決定される。この態様に用いられる技術は、細胞間の化学的差を検出するための赤外イメージングに関して記載されるのと実質的に同様である。本発明のこの態様の好ましい実施形態は、剥離された頸部細胞の研究に関する。

赤外分光計ディテクター技術における現在の技術的利点は、赤外分光分析イメージングの発達を可能にした。頸部細胞サンプルの分析への赤外分光分析イメージングの適用は本明細書に議論される。

振動分光分析イメージングは、生物学的、化学的、及び材料科学での利用を伴う比較的新しいイメージング様式である (Lewis, E.N.ら、Anal. Chem., 67: 3377~3381 (1995))。柔軟かつ強力な技術である振動分光分析イメージングは、分光分析の分子分析の分子同定力に、2-D及び潜在的に3-Dイメージングにより組織サンプルの形態及び領域化学特性を視覚化する能力を組合せる。更に、振動分光分析イメージングは、研究下でサンプル内の関心の分子の分布について定性的及びBeer's Lawの適用により定量的データへのアクセスを供する。

典型的な近IRイメージング装置はIR顕微鏡(Bio-Rad UMA 500A)及びアンチモン化インジウム(InSb)焦点面アレイ(FPA)ディテクター(Imag IR, Santa Barbara Focalplane)につなげたステップスキャンフーリエ変換マイケルソン干渉計(Bio-Rad FTS-60A)を利用する。顕微鏡光学構成物及び干渉計電気構成物は、InSbディテクターに有効につながるように変えられる。光学的な改良は、顕微鏡

の対物レンズとFPAとの間にCaF<sub>2</sub>レンズをおくことからなる。電氣的改良は、干渉計及びFPAディテクターのステッピングと同調するカウンタ／タイマーボードを加えることからなる。データを得ること及びその処理は、慣用的FT-IR研究の間に行われるのと同様である。要するに、干渉計は、スペクトルイメージファイル(SPIFF)として形成され、フーリエ変換される。SPIFFファイルは、市販のイメージプロセッシング及び視覚化ソフトウェアを用いて視覚化することができる。(例えば、Chem Image. 1.0, Chem Icon, Optimas. 4.02等)。典型的な中IRイメージングシステムは、上述と同じ構成物の多くを有するが、FPAがMCT(テルル化水銀カドシウム)ディテクターであり得る点で異なるだろう。また、顕微鏡の対物レンズとディテクターとの間のレンズはCaF<sub>2</sub>、ガラス又は石英であり得る。

赤外顕微イメージング装置は、例えばBio-RadのFTS Stingray 6000 (Bio-Rad, Cambridge, MA)で市販される。赤外イメージングは、干渉計の多重送信力を多重チャンネルディテクターと組合せることにより可能になる。多重チャンネルディテクターは、各々のピクセルのスペクトルが同時に収集されることを許容し、その干渉計は、全ての関連する波長が同時にモニターされるのを許容する。

現在、当該技術のFPA デテクターは、100万のデテクター要素及び1秒当り16,000,000ピクセルの過剰な読みとり速度を有する。IRイメージングで作られるイメージの分解能は、FPA 上のデテクター要素の数によってのみ限定される。更に、FPA デテクターは、 $10,000\text{cm}^{-1}$ ～ $500\text{cm}^{-1}$ の範囲の波長における光にセンシティブである材料から作製することができる。最後に、典型的なIRイメージング実験において大量のデータが収集されるが(128×128 デテクターアレーは16,384ピクセルを供する)、多重送信／多重チャネル

ル装置のセット・アップは、迅速なデータの獲得を許容する。例えば、Lewis 及び共同研究者らは、12秒だけで $16\text{cm}^{-1}$ 分解能で16,384ピクセルを含むデータセットを収集することを報告している (Lewis, E, N ら、Anal. Chem., 67: 3377～3381 (1995) )。

他に示さなければ、(例えばデータの比較、予測スコアの形成及びカットオフ間隔の形成のための) 一般的方法は、本発明の列挙された態様及び実施形態に適用できることを当業者は理解するだろう。

#### 実施例

以下の詳細な実施例は、慣用的な頸部スミアの間に回収された正常、正常形成異常、形成異常及び悪性頸部細胞間を識別するのに適用される本発明の方法を記載する。本実施例は、バルクFT-IR分光法、FT-IR頸微分光法及びFT-IR分光イメージングの使用を記載する。

本明細書に含まれる詳細な議論の多くは代表例としての頸部細胞の使用によるが、この細胞型の使用に、本発明の方法は頸部細胞サンプルのみでの利用を有すると推論することを意図しない。その方法が、一連の異なる細胞における細胞間の化学的変化の分析及び／又は病状の診断への少しの改良に広げることができることは当業者に明らかであろう。例えば、胸、膀胱、男性又は女性の生殖系(例えば前立腺、卵巣等)、肝臓、リンパ節、骨、脾臓及び他の器官又は構造の細胞における化学的変化の分析及び／又は病状の診断は本発明の範囲内である。上述のリストは、例示されるが排他的でないことを意図する。これにより、以下の実施例は、実例の目的のためにのみ供され、本発明を限定することも、規定するこ

とも意図しない。

実施例1は、主成分分析(PCA)と組合せた赤外分光法を用いる悪性及び前悪性頸部癌状態の検出を示す。実施例2は、部分最小二乗分析(PLS)を用いる中赤外技術を用いる頸部異常の診断、並びに染色し、慣用的な顕微鏡により検査したPapスミアの比較を供する。実施例3においては、(Pap細胞学により診断した)形成異常の頸部剥離物、及び(Pap細胞学により)正常として診断されたが形成異常の経歴を有する頸部剥離物(例えば、“正常-形成異常”と診断された試料)のスペクトル間に密接な類似性があることを示す。実施例4は、頸部細胞内の悪性及び前悪性状態の検出のための単一細胞・FT-IR分光法の使用を示す。

実施例5～8は、FT-IR顕微分光法の使用、及びデータを得て次にPCA及び/又はPLSで処理した乾燥頸部細胞サンプル中の単一細胞からのスペクトルの獲得を示す。その処理データは、表現型的に分化した細胞のスペクトルについての分散プロファイルを作製するのに用いられる。その分散プロファイルは、明白に証明できる診断の利用性を有し、正常、正常-形成異常、形成異常及び悪性細胞の間の識別を許容する。

実施例5は、明確なスペクトルパターン(パターンI、パターンII)を示す正常と診断された細胞からのIRスペクトルの検定/標準セットの作製を示す。同様に、実施例6は、パターンIスペクトルを示す正常細胞及びパターンIIスペクトルを示す形成異常細胞からのIRスペクトルの検定/標準セットの作製を示す。実施例7は、パターンIスペクトルを示す正常細胞及びパターンIIスペクトルを示す悪性細胞からのスペクトルから構成される検定/標準セットを示す。最後に、図8は、パターンIIスペクトルの正常細胞及びパターンIIスペクトルを示す悪性細胞からのIRスペクトルの検定/標準セットを示す。実施例5～8において、検定/標準セットを頸部スミ

アからのFT-IRスペクトルと比較した。その比較は、PLS及び/又はPCRを用いて行った。

#### 実施例1



本実施例は、主成分分析と共に赤外分光法を用いての悪性及び前悪性頸部癌状態の検出を示す。

### 1. 1 材料及び方法

Wongら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 10988~10992(1991)に記載される方法によって収集した頸部剥離物から436のスペクトルを得た。赤外スペクトルの主成分分析によりPap スミア診断を予測する可能性についてスペクトル及びPap スミア診断を分析した。他に示さなければ、分析は $1200\text{cm}^{-1}$ ~ $1000\text{cm}^{-1}$ の周波数域に限定した。全てのスペクトルは、最少吸光度を0.0吸光度に、最大吸光度を1.0吸光度にセットするように、 $1200\text{cm}^{-1}$ ~ $1000\text{cm}^{-1}$ の周波数域に標準化した。

### 1. 2 結果

標準化後のスペクトルの視察は2つの基本的パターンを示した。1つのパターンは $1025\text{cm}^{-1}$ 周囲の主要なピークを示し（図1を参照のこと）、そして典型的に正常な頸部剥離物で観察されるもののスペクトルの特徴を有した（Wongら、前掲を参照のこと）。第2の基本パターンは、 $1025\text{cm}^{-1}$ 領域又はその周辺にピークを示さず（図2）、悪性試料について報告されるスペクトルの‘典型’であった。いくつかの場合、スペクトルは2つのパターンの混合、及び／又は不規則であるか、又は縞を示した。最初の分析は‘典型的な’正常の及び悪性のスペクトルを示すサンプルに焦点をあて、そして異常なスペクトルの特徴である全ての他の試料（例えば混合の又は異常なもしくは縞のパターンのもの）を排除した。

表 1  
検定データセットのPCA 分析

ランク	SS	累積
1	70.03%	70.03%
2	15.07%	85.11%
3	7.76%	92.86%
4	3.77%	96.63%
5	1.50%	98.13%
6	0.72%	98.85%
7	0.40%	99.25%
8	0.24%	99.49%
9	0.18%	99.68%
10	0.12%	99.80%

次に以下の通り、これらの所定のスペクトルのサブセット上で検定セットを形成した：1つの標準は正常な頸部剥離物の‘典型’であるスペクトルの正常試料を含み（図1）、そして他方の悪性サンプルは癌の典型であるスペクトルを含む（図2）。正常な頸部剥離物からのスペクトルを、0のダミー変数に割り当て、悪性剥離物からのスペクトルを1つの値に割り当てた。各々4番目のスペクトルを検定セットから除き、確認サンプルとして用いた。

表1は、各々の主成分により解析した平均化後のスペクトルの平方の総和（SS）を要約する。これらの値の計算は、Haalandら、Anal. Chem. 60:1193~1202（1988）及びCahnら、Applied Spectroscopy 42:865~872（1988）に記載される方法によって行った。表にした結果は、スペクトル中のバリエーションの99%超が最初の7の主成分によって計算できることを示す。

7のランクは、その検定から省いたいくつかのランダムに選択した確認サンプルの交差確認分析上で最も優れた識別を供するように選択した。このランクは、悪性サンプルの最小予測値及び正常サンプルの最大予測値対PCRモデルランクを

表にすることに基づいて選択した（表2）。

表 2  
予測ダミー変数対PCR モデルランク

ランク	悪性の最小予測値	正常の最大予測値
1	0.93	0.14
2	0.95	0.10
3	0.92	0.16
4	0.92	0.19
5	0.90	0.09
6	0.94	0.09
7	0.95	0.08
8	0.95	0.08
9	0.95	0.12
10	0.94	0.11

ランク7において、悪性確認サンプルについてのダミー変数の最小予測値は0.95（1.0に近い）であり、そして正常な確認サンプルについてのダミー変数の最小予測値は0.08であった。以後、ランク7は、436のスペクトルの全体のセットを分析するのに用いた。次にヒストグラムを、162の正常なサンプル及び19の悪性サンプルを用いて、予測ダミー変数についてコンピューター処理した。0.5の区切り点（BP）は、正常なスペクトルと悪性のスペクトルとの間の合理的な識別を供した（図3及び図4を参照のこと）。

### 1. 3 全てのスペクトルのPCA 分析

サンプルセットの全てのスペクトルについてF比を計算した。これらの値は、Haalandら、Anal. Chem. 60: 1193~1202（1988）に記載される方法に従って計算した。F比は、サンプルスペクトルが検定スペクトルに対していかに類似するかの示度である。高いF比は、例えば、サンプルが分析した検定スペクトルに似ていない場合に生じ得る。本研究において、25以上のF比の全てのスペクトルは

、検定スペクトルからよごれているか又は明らかに区別できるかを見い出す視覚的検査により行った。

これにより、25以上のF比は、アウトライアースペクトルの排除のための拒絶しきい値として任意的に選択した。この選択は、後に診断のために用いられるスペクトルのセットに、（純粹に視覚的な検査によっては得ることができない）一貫性を供する。この基準に基づいて、40/436のサンプルを“貧弱な”スペクトルの試料として排除した。表3は、診断コード、及びF比基準による排除後の各々の診断クラスにある試料の数を要約する。

0.5の区切り点に基づき、25未満のF比を有する396のサンプルを、スペクトルに基づくこの線形的識別機能に従って正常又は悪性として分類した。以下のコンチンジェンシー表（表4）はその結果を要約する。

表4は、悪性試料（例えばコードm）を排除して、各々の個々の診断されたカテゴリーの予測分布に差のない帰無仮説に基づく。帰無仮説のカイ二乗テストは、自由度21で44.9の値を示した。その帰無仮説は、 $p = 0.002$ の有意レベルで拒絶される。このことは、その診断のいくつかは分光分析により正常として予測されるのとは異なる度数に関係することを示唆する。カイ二乗値（ $X^2$ ）のコンピューター処理を、以下の通り悪性サンプル（コードm）を排除するこ

とにより、標準統計法によって行った：最初に、カラム0及びカラムmにおける数の和を計算した。これらの数は、各々286及び91であるとい出された。次に、その“観察された”値の各々について、予想される値を計算した。コラム0におけるこれらの予想値は、（各々の列の合計）に、（377で割ったカラム0における観察された数の合計）をかけることに基づいて計算した。数字377は全ての列の合計を示す。例えば、異常と診断されたもの（コードa）についてコラム0における39.4の“予想値”は、数字52（例えばその列の合計） $\times (286 \div 377)$ からとったものである。

表 3

診断コード	試料の総数	Pap スミア報告
0	174	正常
a	52	異常
ab	4	観血性スミアでの異常
abi	4	異常細胞及び炎症の病状を有する観血性スミア
ai	27	炎症の証拠のある異常
air	5	炎症の証拠のある異常（反応性）
ar	19	異常（反応性）
at	2	萎縮性パターンでの異常
b	6	観血性スミア
bi	2	炎症の証拠のある観血性スミア
br	2	反応性細胞を含む観血性スミア
bx	2	観血性及び無細胞スミア
d	8	形成異常
i	30	炎症
ib	1	炎症及び観血性スミア
ir	7	反応性細胞を有する炎症
it	4	萎縮性パターンでの炎症
m	19	その場での悪性又は癌
r	4	反応性
rt	1	萎縮性パターンでの反応性
t	19	萎縮性パターン
tx	3	萎縮性パターンでの無細胞
x	1	無細胞
合 計	396	

表 4

## 0.5 区切り点に基づくコンチンジェンシー表

診 断	観 察 値			予 想 値			
	合 計	0	m	0	m	$X^2$	p
0	174	148	26	132	42		
a	52	39	13	39.4	12.6	2.18	0.140
ab	4	1	3	3.03	0.97	6.41	0.011
abl	4	2	2	3.03	0.97	1.46	0.226
ai	27	21	6	20.5	6.52	0.46	0.497
air	5	3	2	3.79	1.21	0.80	0.370
ar	19	16	3	14.4	4.59	0.06	0.810
at	2	0	2	1.52	0.48	5.28	0.022 <sup>x</sup>
b	6	3	3	4.55	1.45	3.00	0.083
bl	2	1	1	1.52	0.48	0.15	0.703
br	2	2	0	1.52	0.48	0.17	0.682
bx	2	1	1	1.52	0.48	0.15	0.703
d	8	4	4	6.07	1.93	4.52	0.034
i	30	21	9	22.8	7.24	3.09	0.079
ib	1	1	0	0.76	0.24	0.98	0.322 <sup>x</sup>
ir	7	6	1	5.31	1.69	0.24	0.622
it	4	3	1	3.03	0.97	0.02	0.880
m	19	4	15	---	---	38.2	0.000 <sup>*</sup>
r	4	2	2	3.03	0.97	1.46	0.226
rt	1	0	1	0.76	0.24	0.92	0.337 <sup>x</sup>
t	19	9	10	14.4	4.59	13.65	0.000 <sup>*</sup>
tx	3	2	1	2.28	0.72	0.00	0.945
x	1	1	0	0.76	0.24	0.98	0.322 <sup>x</sup>
合計:	396	290	106				
合計	377	286	91				

\* は、数字を丸めて  $p = 0.000$  となることをいう。

<sup>x</sup> は、合計から悪性と診断されたサンプル（コードm）を差し引いたものをいう。

<sup>x</sup> は、 $X^2$  値を計算するのに用いた方法が、“観察した”細胞の1つにおいて0を有するp値を解釈する時、注意を働かせることを必要とすることをいう。

コラムm中の“予想される”値は、（各々の列の合計）に（コラムmで観察された数字の合計÷377）をかけることによって計算した。もう一度、例として異常と診断されたサンプル（コードa）を用いて、コラムm中の12.6の“予想”値を、数字52（例えば列の合計

)  $\times (91 \div 377)$  をとることによって計算した。表5は、 $X^2$  値に近づけることにおいて用いた全ての数学的操作を示すコンチンジェンシーの最初の4列を用いる。

表 5

診 断	観察値		予想値		$(O-E)^2$		$(O-E)^2/E$	
	(O)		(E)					
	0	m	0	m	0	m	0	m
0	148	26	132	42	$(148-132)^2$	$(26-42)^2$	1.94	6.09
a	39	13	39.4	12.6	$(39-39.4)^2$	$(13-12.6)^2$	.004	.013
ab	1	3	3.03	0.97	$(1-3.03)^2$	$(3-0.97)^2$	1.36	4.25
abi	2	2	3.03	0.97	$(2-3.03)^2$	$(2-0.97)^2$	0.35	1.09

$$X^2 = \sum (O-E)^2/E$$

= (悪性サンプルを除いた) 全ての診断についてのコラム A 中の  
数字の合計 + コラム B 中の数字の合計

= 44.9 (21 自由度での 44.9 の  $X^2$  値は  $X^2$  分布表から  $p = 0.002$   
を算出する)

全体としてのコンチンジェンシーについての上述の大きな確率 (例えば  $p = 0.002$ ) で、次に診断クラスが正常なサンプルと異なる予想分布を有することを見出すための試みを行った。従って、(Yates 相関での) カイ二乗テストを、もう一度、個々の  $2 \times 2$  サブテーブルについてこの間で、各々最初の列 (正常と診断されたもの) をとってコンピューター処理した。a, b, c、及び d が示すように  $2 \times 2$  表の細胞の数を示すなら、

	観察値	
診 断	a	b
	c	d

$$\frac{[(ad-bc)の絶対値 - 0.5(a+b+c+d)]^2 [a+b+c+d]}{(a+b)(c+d)(b+d)(a+c)}$$

$X^2$  を次の通り計算した :

これにより、悪性サンプルでは、例えば：

観察値		
診 断	0	m
0	148	26
m	4	15

$$X^2 = \frac{[(148 \times 15 - 26 \times 4) \text{の絶対値} - 0.5(148 + 26 + 4 + 15)]^2 [148 + 26 + 4 + 15]}{(148 + 26)(4 + 15)(26 + 15)(148 + 4)}$$

$X^2 = 38.2$  ( $X^2$ 分布表に基づく、38.2の $X^2$ 値は $p < 0.001$ に相当する)

高い確率 ( $p$ ) の診断カテゴリーは、そのカテゴリー内のサンプルが正常な試料と同様の分布を有することを示す。しかし、低い確率のものは異なって分布した。これにより、表4に示すように、“悪性”と予想される高い有意度数は予想されるように、悪性と診断されるサンプルと関連した ( $p < 0.001$ )。また、高い有意度は、“萎縮パターン” ( $p < 0.001$ ) と診断されたサンプルについての予測であった。更に、予測度は、観血性スミアを伴う異常、萎縮性パターンを伴う異常及び形成異常 (例えば各々診断コードab, at及びd) として診断された試料について予想される ( $p \leq 0.05$ ) よりかなり高かった。

統計精度について有利であり得る上述のコンチンジェンシー表 (表4) を分析する他の方法がある。例えば、統計的ルーチンのSASライブラリ内のルーチン “PROC FREQ” (The SAS Institute Inc.

, Cary, NC) は、この全体の表及び  $2 \times 2$  コンチンジェンシー表の帰無仮説の確率を計算するのに用いた。このルーチンは、表内のいくつかのセルが0である場合に好まれ得る “Fisher's Exact” テストも計算することができる。1又は複数の診断サブグループ内のサンプルの分布が正常な診断のサンプルのそれと異なる確率を計算するのに用いることができる他の試みは、カイ二乗テストにより分析され得る正常対全ての他の診断の  $2 \times 2$  表を作製する前に、全ての異なる診断についてのデータ (好ましくはこのような差があると予想される0, d, 及びmの診断を除外するもの) を統合することであろう。

## 実施例 2



本実施例は、部分最小二乗分析を用いる中赤外技術での診断及び慣用的顕微鏡に適用するPap スミアの比較を供する。

## 2. 1 試料収集

頸部剥離物を、普通のブラッシング手順によって収集した。各々のブラシからの剥離した細胞を、通常の塩類溶液を含む別個のバイアル中に収集した。各々のバイアル中の細胞懸濁液をパスツールピペットで分配し、2つの等量の部分に分けた。その細胞懸濁液の1つを遠心し、そのペレットを液体窒素内に、顕微鏡分析まで凍結保存した。他方を顕微鏡スライド上にスプレーし、固定して、パパニコラウ (Papanicolaou) 染色により染色して、少なくとも1の病理学者により検査した。分析した302の頸部剥離物のうち、206のサンプルを形成異常クリニックから得て、96の試料を外来婦人クリニックから得た。その試料に3つの型の診断を割り当てた。細胞学的な異常性の証拠を示さず、頸部異常の経歴のない個体から得た試料を“正常-正常”として分類した。正常な細胞を有し、以前に形成異常の経歴を、もつ個体から得た試料を“正常-形成異常”とした。

形成異常の証拠を示す試料を普通の命名法を用いて、病気の程度に従って分類した。ヒトパピローマウイルスを有することが見いだされたサンプルを文字“HPV”で示し、“形成異常”として診断されたサンプル中に含まれていた。

表6は、各々の型の試料の数及び診断を要約する。

## 2. 2 分光分析

頸部剥離物の解凍したペレットを、以下の通り、分光分析により分析した：頸部剥離物をパスツールピペットでそのシリンジ作用により混合し、次に、その細胞懸濁液をスミアにし、Cleartran 窓 (ZnS) 上で乾燥させた。DTG デテクターを備えた Bio-Rad, Digilab FTS 165 スペクトロメーター上で、室温において、中赤外スペクトルを得た。4  $\text{cm}^{-1}$  の分解能でスペクトルを収集し、100 のスキャンを同時に行った。各々のスペクトルのバックグラウンド標準のために、Cleartran 窓の単一ビームスペクトルを用いた。各々のスペクトルも、最小吸光度を0.0に、最大吸光度を1.0にセットすることにより標準化した。サンプルを乾燥させて、操作が容易で、高質のスペクトルを生ずる試料を得た。

表 6

試料の型	数
正常－正常	96
正常－形成異常	152
形成異常の型	
CIN I	30
CIN II	5
CIN III	3
CIN I－II	8
CIN II－III	1
CIN I－HPV	4
CIN II－HPV	1
HPV	2
試料の総数	302

### 2. 3 部分最小二乗分析

PLS 分析のために選択した302 のスペクトルのうち、54スペクトルは形成異常と診断された試料から、152 スペクトルは、‘正常－形成異常’と診断された試料から、そして96スペクトルは‘正常－正常’と診断されたサンプルからのものであった。次に、形成異常及び‘正常－正常’スペクトルの1つのサブセットを用いて検定セットを形成した。他に示さなければ、検定（標準）セットに含まれる‘正常－正常’試料全ては、図1のスペクトルに似る又はそれと同一であるスペクトルを有した（例えば、正常の頸部剥離物をキャラクタライズするWong及び共同研究者らにより報告されたスペクトル）。形成異常の標準試料を1のダミー値に割り当て、そして‘常－正常’標準を0の値に割り当てた。検定セットに含まれないス

ペクトルは、確認サンプルとして用いた。サンプル間を識別するために0.5 の区切り点を用いた。予測区切り点0.5 未満の全ての試料が正常として分類され、予

測値0.5以上のものは異常と分離された。

## 2. 4 結果

データの分析において3つのスペクトル領域を利用した。これらの領域は、1250～1000 $\text{cm}^{-1}$ 、1420～1330 $\text{cm}^{-1}$ 、及び3000～2800 $\text{cm}^{-1}$ の間のゾーンを含んでいた。ランク8は、サンプル間を最もよく識別するものとして選択した。17以上のF比は、アウトライアースペクトルの排除のための拒絶しきい値として任意に選択した。表7は、確認サンプルと共にPLSの結果を要約する（例えば27の形成異常、44の“正常-正常”及び152の“正常-形成異常”試料）。

表 7

	総数	F比<17の 総サンプル	観察値		
			N	D	X <sup>2</sup>
診断					
正常-正常	44	40	31	9	
正常-形成異常	152	146	49	97	23 p < 0.001
形成異常	27	27	3	24	25.8 p < 0.001
総数	223	213			

N及びDは各々“正常-正常”及び“形成異常”として予想されるサンプルをいう。

表7に示すように、全部で10のサンプル（例えば4の“正常-正常”、及び6の“正常-形成異常”）を本研究から排除した。その排除したサンプルの各々は17以上のF値を有していた。“正常-正常”として同定された試料、並びに“正常-形成異常”又は“形成異常”の試料の試料の予測分布に差がないとする帰無仮定に基づく

最初の列（“正常-正常”診断）で各々とした2×2サブテーブルのカイ二乗分析は、各々23、及び25.83のX<sup>2</sup>値を算出した。その帰無仮説は、p < 0.001の有意レベルにおいて“正常-形成異常”及び“形成異常”試料の両方について拒絶された。表7に示すように、形成異常のサンプルの予測の高い有意度は形成異

常サンプルに関連した。また、高い有意性は、“正常－正常”サンプルに対して

“正常－形成異常”として分類された試料の分布の差であった。

これらの結果は、“正常－正常”試料、及び形成異常がある又はその経歴がある試料の間を識別することにおけるPLSの能力を証明する。

### 実施例 3

本実施例は、形成異常の頸部剥離物、及び正常として診断されるが形成異常の経歴のある頸部剥離物（例えば“正常－形成異常”と診断された試料）のスペクトル間に密接な類似性があることを証明する。

先のデータを用いて周知の形成異常のサンプル及び“正常－形成異常”のサンプルからのスペクトルからなる検定セットを作製した。この分析の目的は、形成異常の頸部剥離物のスペクトルが“正常－形成異常”の頸部剥離物のスペクトルと異なるか否かを決定することである。PCA及び識別分析を用いて、2つの集団の間に有意な識別は観察されなかった。観察できる差がないことにおいて、この分析は、Pap スミアの細胞学的外観にかかわらず、形成異常の経歴を有する患者の大部分において、IRスペクトルに適用した方法が異常なものを検出したことをこの分析に示唆する。従って、ここで実施されるIR分光法は、頸部スミアの普通の細胞学的検査ではできない更なる診断情報を供する。頸部の形成異常の大部分の起源は、ヒトパピローマウイルスによると信じられていることに注目すれば、

これらの異常なスペクトルの特徴は、“正常－形成異常”に分類される患者の頸部剥離物中のHPV ウイルスの存在に直接関連し得る。

これにより、本発明のIR法は、形成異常又は悪性の経歴のない女性の集団と、（Pap 細胞学により検出して）形成異常もしくは悪性と診断された女性又はPap 細胞学により形成異常と現在は診断されていない形成異常の経歴を有する女性（例えば臨床的に形成異常の高い危険性を有する患者）の集団と、の間を識別することができる。

### 実施例 4

本実施例は、細胞内の悪性及び前悪性状態の検出のための単一細胞赤外分光法の使用を示す。

バルク頸部剥離物の現在の赤外分光分析研究は、正常な及び悪性のサンプルのスペクトルに著しい差を示した。これらの差の存在にかかわらず、それらの正確な起源は未知である。それは、悪性細胞自体の変化が癌に関連するスペクトル異常を生ずることが直観的に合理的であるが、この確証は存在しない。なお更に、いくつかの悪性頸部サンプル中で、癌性細胞が上皮細胞の総数の10%以下を構成し、なおかなり高い割合の悪性細胞のものとそれらの赤外スペクトルが差がないことが観察されている。いずれの特定の理論ともつなけれりつもりはないが、これらの観察についての4つの可能性ある説明が供される。これらは、1) 癌細胞中の変化が、それらが細胞の残り90+%のスペクトル寄与を支配するほど大きい、2) スペクトル変化が細胞の他の型から生ずる、3) Pap スミアにより悪性として形態学的に同定することができない細胞が、悪性細胞と同じ又は同様の化学変化を既に生じており、それゆえ骨にかくれた悪性細胞と共に、異常細胞の大部分を構成する、及び/又は癌細胞が、中赤外領域において強く吸収する化学物質を分泌し、それがスペクト

ル変化に寄与する化学物質であることを含む。

これらの問題のいくつかに注目すると、本発明は、細胞ごとに基づいて頸部剥離物からのスペクトルの獲得のための新規の方法を提供する。

#### 4. 1 方法及び材料

細胞を、特性のZnS (Cleartran) 顕微鏡スライド上に固定し、FTS 165 スペクトロメーターにつなげた Bio-Rad FT-IR UMA-500 顕微鏡下で染色せずに検査した。その孔は、個々の細胞の大きさに調節し、 $8\text{ cm}^{-1}$ の分解能で500 のスペクトルを同時に加えた。中IR域( $950\sim 3000\text{ cm}^{-1}$ )においてスペクトルを分析した。

3つの理由のため、細胞の支持のためのマトリックスとして硫化亜鉛を選択した。それは、慣用的な顕微鏡及びIR顕微鏡下で細胞を見るためにクリアーな支持体を供した。第2に、その材料はPap スミアに用いる染色を含むいくつかの化学物質に耐性であった。第3に、その材料は、関心のIR域でスペクトルを得るのに十分に適していた。

##### (a) 頸部試料の前処理

頸部剥離物を、普通のブラッシング手順によって収集した。各々のブラシから剥離した細胞を、保存液(Preserv Cyt, CYTYC Corporation, Marlborough, MA)を含むバイアル中で静かに振とうした。その保存液は輸送及び保存の間、剥離した細胞の一体性を維持し、頸部剥離物中の赤血球を溶解するようにも機能した。次に、その剥

離した細胞を含むバイアルを CYTYC THIN PREP PROCESSOR®で処理した。そのプロセッサは、粘液及び非診断的デブリスをろ過して落とし、ZnSスライド上の均一な層中に細胞を広げた。この方法において、頸部剥離物から妨害材料の大部分を選択的に除去し、そして細胞の診断に重要な特徴を保護しながら細胞の均一な層を得ることが可能である。赤外顕微分光法を、セルフファインダー(cellfinder)

によりそれらの位置を記録した染色していない剥離した細胞上で行った。その後、そのスライドをババニコラウス染色により染色し、細胞学的に検査した。次に分光分析の結果を、細胞学的分析と相関した。

#### 4. 2 結果

正常な頸部剥離物において、4つのタイプの形態学的に区別できる細胞を研究した。これらの細胞は、成熟した鱗状上皮細胞、中間の鱗状上皮細胞、停基底細胞及び頸管内細胞を含んだ。正常な鱗状上皮細胞について2つの異なるスペクトルが典型的に観察された。1つのスペクトルは正常な頸部剥離物についてのスペクトルと同一であり(図1)、そして他方は $1025\text{cm}^{-1}$ のバンドにおいてかなり減衰していた。図5は、2つの鱗状細胞のスペクトルを示す。正常な細胞の典型的なスペクトルを有する鱗状細胞は集団1で示され、グリコーゲンの特徴である $1025\text{cm}^{-1}$ のバンドを欠くものを集団2とした。エストロゲン欠損(例えば萎縮を示す状態)の閉経期の患者の頸部剥離物において通常豊富に見い出される停基底細胞は、悪性剥離物で観察されるスペクトルに似たスペクトルを示した(図2、Wongら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 8140~8145 (1991)も参照のこと)。この発見は、悪性としての予測の高い有意度が“萎縮パターン”と同定されたPapスミアと関連することを見い出した実施例)のPCA分析を支持した(例えばコ

ンチンジェンシー表、表4コードt,  $X^2=13.7$ ,  $p<0.001$ )。頸管内細胞のスペクトルは $1025\text{cm}^{-1}$ において減衰したピークも示したが、 $1076\text{cm}^{-1}$ 領域の強いバンドも観察された。図6は、癌基底細胞及び頸管内細胞のスペクトルの比較を供する。

頸部の腺癌及び鱗状癌の患者からの悪性細胞の検査は、Wongら；前掲により報告されるスペクトルの特徴を確認した。全ての悪性細胞

は、1)  $970\text{cm}^{-1}$ の主要なバンド；及び2)  $1082\text{cm}^{-1}$ バンドの $1086\text{cm}^{-1}$ へのシフトを示した。 $1025\text{cm}^{-1}$ のバンドの喪失は、癌細胞の主なスペクトルの特徴の1つであった。顕微分光分析は、形成異常として細胞学的に診断されたいくつかの細胞(CIN III)が、正常及び悪性細胞のその間の外観において中間のスペクトルを示した。図7は、CIN IIIの特徴を有する悪性細胞及び形成異常細胞からのIRスペクトルを示す。

いずれの特定の理論とも結びつけることを意図しないが、実験で検出されたスペクトルの変化を行うメカニズムについての現在の仮説を以下に概説する。病気又はプレ病気表現型への通常の表現型からの変化を行うことに基づいて、その頸部細胞集団は、パターンI、パターンII又はパターンIとパターンIIとの間の中間のパターンに相当するスペクトルを示す細胞の数のシフトを行う。このシフトは、頸部細胞サンプルからの吸収データで検出することができ、頸部細胞サンプル中の異なる細胞型間を区別するための基礎を構成し得る。

以下の例は、PLS 又はPCR により形成された予測スコアの分布に基づく単一細胞赤外分光分析が、形成異常及び癌を有するスミアから通常の頸部スミアを区別するのに用いることができる。

#### 実施例 5

実施例5は、明白なスペクトルパターン(パターンI、パターンII)を示す正常と診断された細胞からのIRスペクトルの検定/標準セットの作製を示す。

##### 5. 1 材料及び方法

###### (a) 頸部剥離物のプレ処理

頸部剥離物を収集し、上述の実施例に記載される通り保存した。

## (b) 頸部スミアの調製及び分類

2つの別個のスミアを、CYTYC THIN PREP PROCESSOR® (CYTYC Corporeation, Marlborough, MA)で各々の細胞懸濁液から調製した。1つのスミアは慣用的なパパニコラウ染色により評価し、他方は赤外分光法により評価した。Pap 評価に基づいて、スミアを以下の通り、4つの診断カテゴリーの1つに分離した。1) 現在にも過去にも頸部の病気を患っていない女性から得た形態学的異常を示さないスミアを“正常”とし; 2) 形成異常の経歴の患者から得た形態学的異常を示さないスミアを“正常-形成異常”とし; 3) 新形成に関連する形態学的変化を示すが癌の証拠はないスミアを“形成異常”とし; そして4) 癌の証拠を示すものを“悪性”とした。

全ての試料を診断して分類した後、顕微鏡研究のために16のスミアを選択した。この選択は、各々の診断カテゴリー内で4つのスミアを選択する条件でランダムに行った。これらのサンプルのうち、4つのスミアを、“正常”と、4つを“正常-形成異常”と、4つを“形成異常”と、そして4つを“悪性”として分類した。

## (c) 赤外分光法

ZnS (Cleartran) 顕微鏡スライド上に固定した頸部細胞を、Bio-Rad FTS 165 スペクトロメーターにつなげた Bio-Rad FT-IR UMA-500 顕微鏡下で染色しないで検査した。分光分析のための細胞の選択はランダムに行い、染色していない細胞の形態学的特徴は低倍率でかろうじて検出できるので、細胞学的特徴は選択過程に影響を与えなかった。その孔を個々の細胞の大きさに調節し、700 のスキランを  $8\text{ cm}^{-1}$  の分解能で同時に行った。Cleartran 窓の単一ビームスペクトルを、各々のスペクトルについてのバックグラウンド標準について用いた。他に示さなければ、各々のスミアから、約100 の各々単一細胞に相当するスペクトルを収集した。

## (d) 計量化学的分析

Galactic Industries (Salem, N. H., USA) からの PLSplus® コ



ンピュータープログラムを、部分最小二乗(PLS)及び主成分回帰(PCR)のような異なる多変量技術により個々の細胞のスペクトルを評価するのに用いた。全てのスペクトルを、各々0.0 及び1.0 の最小及び最大吸光度を有するように標準化した。正常及び異常な頸部試料間のスペクトルの変化のほとんどはこの領域内で見られるので、標準化は、 $1000\text{cm}^{-1}$ ～ $3000\text{cm}^{-1}$ の間の領域に限定した。他に示さなければ、PCR 又はPLS 分析において、2つのスペクトル領域を利用した。これらの領域は、 $1200\text{cm}^{-1}$ ～ $1000\text{cm}^{-1}$ 、及び $3000\text{cm}^{-1}$ ～ $2800\text{cm}^{-1}$ の間の周波数域を含んだ。F比の計算及びF比の結果に基づく異なるスペクトルへの確率の割り当ては、Haaland 及びThomasの方法により行った (Anal. Chem. 60:1193 (1988) ; 及び Anal. Chem., 60:1202 (1988) )。0.99より大きい確率に相当するF比を有する全てのスペクトルをアウトライアーサンプルとして排除した。(PLSplus<sup>TM</sup>Add-on Application Software manual for GRAMS/386<sup>TM</sup> ページ61, Galactic Industries Corporation, Salem, New Hampshire)。異なる検定スペクトルについてのランクを、平方の累積予測残存誤差(PRESS)、及びそのPRESS 値の、最小のPRESS 値前の全てのランクとの比較に基づいて選択した。有意性のFテストにおいて0.75のカットオフ確率レベル未満にある第1のランクを、分析のための最適なランクとして選択した(PLSplus<sup>TM</sup>Add-on Application Software manual for GRAMS/386<sup>TM</sup> ページ55～56, Galactic Industries Corporation, Salem, New Hampshire)。

(e) 視覚的検査によるスペクトルの分析

個々の細胞のスペクトルの視察は、主に2つの分光分析パターンを示した。パターンIは、約 $1025\text{cm}^{-1}$ にピークのある主要なバンド、並びに約 $1080\text{cm}^{-1}$ ,  $1160\text{cm}^{-1}$ 、及び $1250\text{cm}^{-1}$ の広いピークの更な

る別個のバンドを特徴とした。パターンIIは、そのピークを喪失した $1025\text{cm}^{-1}$ バンドの振幅の大きな減少、並びに $1080\text{cm}^{-1}$ 及び $1160\text{cm}^{-1}$ バンドの広がりの特徴とし；その $1250\text{cm}^{-1}$ のバンドは対応するパターンIのバンドの特徴を維持した(図8を参照)。全ての他のスペクトルは異常であるか、又は“パターンI”及び“パターンII”スペクトルのハイブリッドであった。

(f) 検定スペクトル

標準の組合せを、正常及び異常な頸部スミア間を区別するためにPCR 及び／又はPLS と組合せて用いることができるが、スペースの制限のため、本明細書の実施例は、分析に用いた4セットの検定スペクトルのみに限定するだろう。

### 5. 2 検定セット I

検定セット I は、各々細胞学的に“正常な”スミアから排他的に得られた2つのスペクトルパターンからなっていた。1の標準は、パターン I スペクトルを示す正常細胞のサブセットを含み、そして他方の標準はパターン II スペクトルを示す正常細胞のサブセットからのものであった。検定セットを調製した後、パターン I を示すスペクトルを0のダミー変数に割り当て、そしてパターン II を示すものを1のダミー変数に割り当てた。3のランクを、識別目的のために選択した。このランクは有意性のFテストにおいて0.75のカットオフ確率レベルの下にある最初のランクであった。

### 5. 3 結果

異なるスミアからのスペクトルを別個のファイルに保存し、PLS 及びPCR により評価した。PLS 及びPCR は各々のスペクトルについての予測スコアを算出した。次に各々のスミアからの予測スコアを保存し、そしてそれらの度数分布のヒストグラムを作製した。表8及び9は一連の上述のデータを示す。これらのデータセットは、各

々のスミアにおけるPLS 予測スコアの分布を示す。図9は、表8のデータセットの1つの代表のヒストグラムである。X軸は、等しく分けたインターバルを示し、左及び右Y軸は、各々、Xインターバル内の度数及び予測スコアの累積割合(%)を示す。

図10は、全てのスミアについての予測スコアの累積割合に基づく0.5 カットオフインターバルにおけるヒストグラム計算を要約する。データは、0.5 カットオフインターバルにおいて、“正常な”スミア、及び“形成異常”又は癌と診断されたスミアからの累積予測スコア割合(%)間にオーバーラップがないことを明らかに示す。しかし、“正常-形成異常”と分類されたスミアと共に形成異常及び癌スミアの累積予測スコア割合間にいくつかのオーバーラップが存在する。図

10には、各々の診断カテゴリーにおける予測スコアについての（即ち4つの群のスミアにおける）平均及び平均の標準誤差が含まれる。

表 8

検定セット I を用いる正常又は正常一形成異常と診断された頸部 スミアにおける予測スコアの分布									
正常 試料番号	1		2		3		4		
インターバル	累積度数(%)		累積度数(%)		累積度数(%)		累積度数(%)		
-0.3	1	0.95	0	0.00	0	0	0	0	
-0.2	8	8.57	2	2.04	0	0	7	7	
-0.1	5	13.33	6	8.16	3	3	8	15	
0	3	16.19	3	11.22	15	18	5	20	
0.1	4	20.00	0	11.22	8	26	5	25	
0.2	3	22.86	5	16.33	5	31	3	28	
0.3	3	25.71	6	22.45	3	34	7	35	
0.4	3	28.57	5	27.55	6	40	3	38	
0.5	4	32.38	10	37.76	3	43	5	43	
0.6	15	46.67	19	57.14	8	51	12	55	
0.7	27	72.38	23	80.61	21	72	22	77	
0.8	28	99.05	19	100.00	27	99	23	100	
0.9	1	100.00			1	100			
総数	105		98		100		100		
正常一形成異常 試料番号	1		2		3		4		
インターバル	累積度数(%)		累積度数(%)		累積度数(%)		累積度数(%)		
-0.1	4	4.08	6	6.12	2	2.04	5	5.26	
0	1	5.10	10	16.33	7	9.18	15	21.05	
0.1	0	5.10	8	24.49	4	13.27	7	28.42	
0.2	4	9.18	10	34.69	3	16.33	4	32.63	
0.3	0	9.18	8	42.86	4	20.41	3	35.79	
0.4	2	11.22	8	51.02	6	26.53	1	36.84	
0.5	1	12.24	5	56.12	5	31.63	4	41.05	
0.6	3	15.31	8	64.29	11	42.86	3	44.21	
0.7	17	32.65	15	79.59	19	62.24	13	57.89	
0.8	65	98.98	20	100.00	37	100.00	36	95.79	
0.9	1	100.00					4	100.00	
総数	98		98		98		95		

データの統計計算は、正常な試料対形成異常及び癌のスミアの平均スコアにおける有意差を明らかに示す。この差についての1つの説明は、異常なスミア（例

えば形成異常及び癌)と比べて、正常なスミアは、より多くのパターンIスペクトルを示す細胞及びより少

いパターンIIスペクトルを示す細胞を有することであり得よう。この観察は、正常なスミアの平均予測スコアが0に最も近く、他方、異常な試料においては1に最も近いという観察結果に基づく(例えば、パターンI及びIIに関連する標準スペクトルを各々0及び1のダミー変数に割り当てたことを思い出させる)。正常→正常→形成異常→形成異常→癌の頸部の病気の進行に伴う、スペクトル変化の大きさの増加にも気づく例えば、正常頸部スミアは0.443の平均予測スコアを示すが、“正常→形成異常”、形成異常及び癌の試料は各々0.499, 0.621及び0.643の増加する平均スコアを示した。PCRによるスペクトルの分析は、同じことを見い出した(データは示さない)。

表 9

検定セットIを用いる悪性及び形成異常頸部スミアにおける 予測スコアの分布									
癌 試料番号	1		2		3		4		
インターバル	累積度数(%)		累積度数(%)		累積度数(%)		累積度数(%)		
-0.1	0	0.00	0	0	0	0.00	0	0	
0	1	1.01	0	0	0	0.00	0	0	
0.1	2	3.03	3	3	1	1.08	0	0	
0.2	2	5.05	2	5	2	3.23	1	1	
0.3	9	14.14	4	9	3	6.45	0	1	
0.4	6	20.20	7	16	1	7.53	1	2	
0.5	7	27.27	9	25	2	9.68	5	7	
0.6	10	37.37	8	33	4	13.98	2	9	
0.7	21	58.59	23	56	20	35.48	20	29	
0.8	41	100.00	42	98	56	95.70	65	94	
0.9			2	100	4	100.00	6	100	
総数	99		100		93		100		
形成異常 試料番号	1		2		3		4		
インターバル	累積度数(%)		累積度数(%)		累積度数(%)		累積度数(%)		
-0.2	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	
-0.1	1	0.98	1	1.25	3	2.86	0	0.00	
0	0	0.98	0	1.25	6	8.57	1	1.01	
0.1	0	0.98	2	3.75	3	11.43	0	1.01	
0.2	0	0.98	2	6.25	4	15.24	0	1.01	
0.3	2	2.94	3	10.00	3	18.10	1	2.02	
0.4	4	6.86	2	12.50	2	20.00	2	4.04	
0.5	1	7.84	3	16.25	5	24.76	3	7.07	
0.6	11	18.63	6	23.75	20	43.81	3	10.10	
0.7	37	54.90	26	56.25	34	76.19	28	38.38	
0.8	46	100.00	33	97.50	25	100.00	61	100.00	
0.9			2	100.00	0				
総数	102		80		105		99		

## 実施例 6

実施例 6 は、パターン I スペクトルを示す正常な細胞及びパターン II スペクトルを示す形成異常細胞からの IR スペクトルの検定／標準セットの作製を示す。

## 6. 1 材料及び方法

実施例6に用いる材料及び方法は実質的に実施例5に記載されるのと同じである。

## 6. 2 検定セットII

検定セットIIは2つの標準スペクトルから構成される。1つの標準は、パターンIスペクトルを示す正常な細胞及び“正常”と診断されたスミア由来の正常細胞のサブユニットを含む。第2の標準は、パターンIIスペクトルを示すが、“形成異常”と細胞学的に分類されたスミア由来の細胞のサブセットを含む。これらの標準スペクトルは、2つのスペクトルパターンの全体の代表であることを確実にするために、ランダムに、異なる正常及び形成異常スミアから選択した。パターンIを示すスペクトルを0のダミー変数に割り当て、パターンIIを示すスペクトルを1のダミー変数に割り当てた。1のスペクトル領域のみをPCR及びPLS分析に利用した。この周波数域は $1200\text{cm}^{-1}$ ～ $1000\text{cm}^{-1}$ のゾーンを含む。識別目的のため、分析のために6のランクを選択した。

## 6. 3 結果

表10～13は、標準スペクトルとして検定セットIIを用いてPLSにより行われた計算に基づく一連の別個のデータを示す。各々のデータセットは1のスミアを示し、そのスミア内の予測スコアの分布を要約する。表14は、各々のスミアについて計算した予測スコアの平均及び標準偏差を供する。そのデータの統計分析は、形成異常又は癌を有する試料に対する正常な試料の予測スコアの平均における有意差を示す。検定セットII対検定セットIを用いるPLS結果の比較は、形成異常又は癌を有するスミアに対して正常な頸部スミアの予測スコアの平均におけるより広がった広がりを示した。この差についてはいくつかの可能な説明があるが、我々は、この変化は、正常

な試料における細胞のパターンをスペクトルと形成異常の試料における細胞のパターンIIスペクトルとの間の微妙な差によりもたらされると推測する。正常細胞の形成異常への進行は、生化学的に誘導され得、そしてIR分光法は、これらの生化学的変化の結果又は原因への1つの糸口を供し得るだろう。更に、先の検定におけるもののよう、ここでの結果は、正常な頸部スミアは、パターンIIスペク

トルの細胞が優勢である形成異常スミアと比べて、パターンIスペクトルの細胞のより高い割合を有することを示す。正常のスミアの予測スコアの平均が0に近く、異常なスミアのそれが1に近いことは、この結論を支持する（例えば、パターンI及びIIに関する標準スペクトルは各々0及び1のダミー変数に割り当てた）。最後に、0.5 カットオフインターバルにおける全てのスミアについてのヒストグラムの結果の累積予測スコアを検査するなら、検定セットIIは、検定セットIと同様に、形成異常及び癌のスミアから正常なスミアを明らかに分離する（図11を参照のこと）。

PCR 分析を用いての観察結果も同様であった（データは示さない）。

表 10

検定セットIIを用いる悪性頸部スミアにおける予測スコアの分布									
インター バル	サンプル番号1 累積度数(%)		サンプル番号2 累積度数(%)		サンプル番号3 累積度数(%)		サンプル番号4 累積度数(%)		
-0.1	0	0	0	0	1	1.086957	0	0	
0	0	0	0	0	0	1.086957	0	0	
0.1	6	6.185567	3	3.030303	1	2.173913	0	0	
0.2	3	9.278351	2	5.050505	1	3.26087	0	0	
0.3	9	18.5567	8	13.13131	0	3.26087	1	1.06383	
0.4	4	22.68041	4	17.17172	1	4.347826	0	1.06383	
0.5	4	26.80412	6	23.23232	4	8.695652	3	4.255319	
0.6	6	32.98969	9	32.32323	1	9.782609	3	7.446809	
0.7	16	49.48454	12	44.44444	6	16.30435	3	10.6383	
0.8	30	80.41237	36	80.80808	14	31.52174	15	26.59574	
0.9	12	92.78351	12	92.92929	31	65.21739	24	52.12766	
1	1	93.81443	5	97.9798	17	83.69565	29	82.97872	
1.1	4	97.93814	0	97.9798	10	94.56522	11	94.68085	
1.2	1	98.96907	2	100	2	96.73913	5	100	
1.3	1	100	0	100	1	97.82609	0	100	
1.4	0	100	0	100	0	97.82609	0	100	
1.5	0	100	0	100	1	98.91304	0	100	
1.6	0	100	0	100	1	100	0	100	
総数	97		99		92		94		

表 11

検定セットIIを用いる形成異常頸部スミアにおける予測スコアの分布									
インター バル	サンプル番号1 累積度数(%)		サンプル番号2 累積度数(%)		サンプル番号3 累積度数(%)		サンプル番号4 累積度数(%)		
-0.2	0	0	0	0	0	0	1	1.111111	
-0.1	0	0	0	0	1	0.952381	0	1.111111	
0	0	0	0	0	1	1.904762	0	1.111111	
0.1	1	1	0	0	2	3.809524	0	1.111111	
0.2	1	2	0	0	6	9.52381	0	1.111111	
0.3	0	2	1	1.298701	5	14.28571	0	1.111111	
0.4	0	2	2	3.896104	3	17.14286	2	3.333333	
0.5	1	3	3	7.792208	5	21.90476	1	4.444444	
0.6	4	7	7	16.88312	7	28.57143	2	6.666667	
0.7	13	20	7	25.97403	14	41.90476	4	11.11111	
0.8	41	61	23	55.84416	22	62.85714	10	22.22222	
0.9	34	95	19	80.51948	28	89.52381	23	47.77778	
1	4	99	9	92.20779	4	93.33333	26	76.66667	
1.1	1	100	4	97.4028	3	96.19048	15	93.33333	
1.2	0	100	1	98.7013	1	97.14288	4	97.77778	
1.3	0	100	0	98.7013	2	99.04762	2	100	
1.4	0	100	0	98.7013	0	99.04762	0	100	
1.5	0	100	0	98.7013	0	99.04762	0	100	
1.6	0	100	0	98.7013	1	100	0	100	
1.7	0	100	0	98.7013	0	100	0	100	
1.8	0	100	0	98.7013	0	100	0	100	
1.9	0	100	0	98.7013	0	100	0	100	
2	0	100	0	98.7013	0	100	0	100	
2.1	0	100	1	100	0	100	0	100	
総数	100		77		105		90		



表 12

検定セットⅡを用いる正常頸部スミアにおける予測スコアの分布					
インター バル	サンプル番号1 累積度数(%)	サンプル番号2 累積度数(%)	サンプル番号3 累積度数(%)	サンプル番号4 累積度数(%)	
-0.3	3 2.941176	4 4.123711	1 1.010101	1 1.041667	
-0.2	2 4.901961	1 5.154639	3 4.040404	2 3.125	
-0.1	6 10.78431	5 10.30928	6 10.10101	6 9.375	
0	9 19.60784	1 11.34021	7 17.17172	5 14.58333	
0.1	3 22.54902	5 16.49485	9 26.26263	3 17.70833	
0.2	3 25.4902	5 21.64948	8 34.34343	5 22.91667	
0.3	1 26.47059	6 27.83505	10 44.44444	9 32.29167	
0.4	2 28.43137	3 30.92784	3 47.47475	5 37.5	
0.5	5 33.33333	5 36.08247	4 51.51515	9 46.875	
0.6	5 38.23529	26 62.8866	5 56.56566	8 55.20833	
0.7	22 59.80392	22 85.56701	9 65.65657	22 78.125	
0.8	20 79.41176	7 92.78351	26 91.91919	17 95.83333	
0.9	18 97.05882	4 96.90722	6 97.9798	2 97.91667	
1	3 100	3 100	2 100	2 100	
総数	102	97	99	96	

表 13

検定セットⅡを用いる正常及び形成異常頸部スミアにおけるスコアの分布					
インター バル	サンプル番号1 累積度数(%)	サンプル番号2 累積度数(%)	サンプル番号3 累積度数(%)	サンプル番号4 累積度数(%)	
-0.6	0 0	1 1.030928	0 0	0 0	
-0.5	0 0	1 2.061856	0 0	0 0	
-0.4	0 0	1 3.092784	1 1.041667	0 0	
-0.3	0 0	2 5.154639	2 3.125	1 1.086957	
-0.2	2 2.105263	4 9.278351	3 6.25	1 2.173913	
-0.1	2 4.210526	9 18.5567	4 10.41667	7 8.782609	
0	2 6.315789	9 27.83505	2 12.5	8 18.47826	
0.1	3 9.473684	12 40.20619	8 20.83333	6 25	
0.2	1 10.52632	6 46.39175	7 28.125	4 29.34783	
0.3	0 10.52632	9 55.6701	8 36.45833	6 35.86957	
0.4	2 12.63158	11 67.01031	2 38.54167	1 36.95652	
0.5	4 16.84211	4 71.13402	6 44.79167	5 42.3913	
0.6	5 22.10526	8 79.38144	13 58.33333	1 43.47826	
0.7	15 37.89474	11 90.72165	16 75	16 60.86957	
0.8	38 77.89474	5 95.87629	11 86.45833	21 83.69565	
0.9	14 92.83158	3 98.98907	9 95.83333	13 97.82609	
1	5 97.89474	1 100	3 98.95833	2 100	
1.1	2 100	0 100	1 100	0 100	
総数	95	97	96	92	

表 14

検定セットⅡで行った予測スコアの統計分析							
正常な頸部スミア							
サンプル番号	許容できるF比のスペクトルの数	予測スコアの平均	予測スコアの標準偏差	平均の標準誤差	平均値の平均	平均値のSTDEV	
1	102	0.5032	0.3742	0.037051	0.445558	0.042731	0.021366
2	97	0.44248	0.31467	0.03195			
3	99	0.40015	0.3587	0.036051			
4	96	0.4364	0.31748	0.032403			
形成異常の頸部スミア							
1	100	0.75953	0.1262	0.01262	0.772033	0.08356	0.04178
2	77	0.779	0.22067	0.025148			
3	105	0.673	0.282	0.02752			
4	90	0.8766	0.2024	0.021335			
癌の頸部スミア							
1	97	0.6178	0.26742	0.027152	0.741433	0.130744	0.065372
2	99	0.64143	0.23425	0.023543			
3	92	0.831	0.233	0.024292			
4	94	0.8755	0.15946	0.016447			
正常—形成異常の頸部スミア							
1	95	0.6463	0.28262	0.028996	0.444768	0.168378	0.084189
2	97	0.234746	0.35617	0.036164			
3	96	0.436906	0.355538	0.036287			
4	92	0.461121	0.361554	0.037695			

## 実施例 7

実施例 7 は、パターン I スペクトルを示す正常な細胞及びパターン II スペクトルを示す悪性細胞からのスペクトルからなる検定／標準セットを示す。

### 7. 1 材料及び方法

本実施例に用いた材料及び方法は実質的に実施例 5 で用いたものと同じである。

### 7. 2 検定セット III

検定セット III は 2 つの標準スペクトルからなっている。1 方の標準スペクトルはパターン I スペクトルを示し、“正常”と細胞学的に診断されたスミアから

得られた正常な細胞のサブセットを含んでいる。第2の標準スペクトルはパターンIIスペクトルを示し、細胞学的に“悪性”と診断されたスミアから得られた細胞のサブセットを含む。これらの標準スペクトルは、2つのスペクトルのパターンの全体の代表であることを確実にするため、異なる正常及び悪性スミアから各々ランダムに選択した。パターンIを示すスペクトルを0のダミー変数に割り当て、パターンIIを示すスペクトルを1のダミー変数に割り当てた。最終的な分析のため識別目的のため6のランクを選択した。

### 7. 3 結果

全てのスペクトルについて予測スコアを計算するためにPLS分析において検定セットIIIを用いた。次にこれらの予測スコアを、先に作ったエントリーと同一の様式で一連の別個のデータに変換した(表8, 9及び11を参照のこと)。図12は、全てのスミアについての予測スコアの累積割合に基づく0.5からオフインターバルにおけるヒストグラム計算を要約する。そのデータは、0.5カットオフインターバルにおいて、“正常な”スミアの累積予測スコア割合(%)と“形成異常”及び癌と診断されたスミアとの間にオーバーラップが存在しないことを明らかに示した。また、図12に、4つのグループのスミアについての予測スコアの平均及び標準偏差を供する。データの精密な調査は、検定の選択が、種々のカテゴリーのスミアの予測スコアの平均の広がりに影響を与えることを示す。より重要なのは、その広がり程度の程度は検定セットにおけるスペクトルのタイプ及びスペクトルが得られる細胞の異常性の程度に直接関連するようである。それゆえ、癌スミアからの細胞のスペクトルを用いること

において、検定セットIIIによるデータで、予測スコアの平均における最も大きな広がりが見られたことは驚くべきことではない。同様に、全てのグループのスミアについての予測スコアの平均における広がり、検定セットII対検定セットIにより形成されたデータについて最も大きかったことを発見したことは異常ではない。この観察結果についての可能な説明は、予測スコアの平均における差がパターンIIスペクトルに主に関連し、そしてこの変換過程の間、媒介段階として機能する形成異常細胞と共に正常な細胞が癌に次第に変化することによっても

たらされることである。最後に、正常性から悪性への変化において、パターン I スペクトルの特徴を示す細胞の割合 (%) の徐々のシフトも現れたことに注意することが重要である。例えば、最も高いパターン I スペクトルの細胞の割合は“正常な”スミアで見い出され (図 8)、“形成異常”スミアではより低い割合であり、そして“悪性”スミアでは更に低い。

#### 実施例 8

実施例 8 は、パターン I スペクトルの正常な細胞及びパターン II スペクトルを示す悪性細胞由来の IR スペクトルの検定／標準セットを示す。

##### 8. 1 材料及び方法

この実施例に用いられる材料及び方法は、実施例 5 に用いられるものと実質的に同一である。

##### 8. 2 検定セット IV

正常及び癌のスミアのパターン II スペクトルの変化を研究する試みにおいて、パターン II スペクトルのみからなる検定標準を作製した。細胞学的に“正常な”スミアから得られたこれらのスペクトルを 0 のダミー変数に割り当て、そして細胞学的に“悪性の”スミアから選択したものを 1 のダミー変数に割り当てた。識別目的のため

に 6 のランクを選択した。

##### 8. 3 結果

異なるカテゴリーのスミア間の識別は、この標準スペクトルにおいて最も劇的であった。図 13 は、全てのスミアについての 0.5 カットオフインターバルにおけるヒストグラム計算を要約する。0.5 カットオフインターバル以下の予測スコアを有する“正常な”スミア中の細胞の 97% 超のスペクトルでの検定セット IV を用いる PLS 分析は、全ての他のスミアから“正常な”スミアを明らかに分けた。また、直観的に予想されるように、0.5 超の予測スコアのスペクトルの最も高い割合は“悪性”のスミアのグループにおいて見い出された。しかしながら、最も興味深いのは、“正常な”スミア及び“正常-形成異常”の頸部スミアの予測スコアにおける 0.5 カットオフインターバルにおける割合の差であった。例えば、“

正常-形成異常”スミアの細胞の29%~45%が0.5を超える予測スコアを有したのに対し、正常なスミアの細胞の2%以下が0.5を超えるカットオフインターバルであった。

上述の技術が赤外分光法以外の分光技術によって得られた吸収データに適用できることは当業者に明らかであろう。例えば、正常及び異常な細胞の核磁気共鳴(NMR)又は紫外(UV)スペクトルは、本発明の方法を用いて細胞サンプルをキャラクタライズするのに用いることができる。その数を上げた分光技術は実施例により供されるが、本発明の範囲を限定することを意図しない。

細胞学的分析の現在の技術(例えばPap スミア)では、形成異常の経歴のない女性由来の正常な頸部スミアと、このような病気の経歴のある個体由来の正常な頸部スミアとの間を識別することが不可能である。このIR分光分析はこれら2つのグループのスミア間を区別するので、極めて重要な発見である。“正常な”及び“正常-形

成異常の”スミア間の割合の観察された差異は、その形成異常表現型が正常に戻った後長い間維持する頸部細胞中の重大な化学変化を反映すること、並びにこれらの変化がIR分光分析によって検出することができることが実際に有望である。更に、その細胞中のこれらの化学的変化がヒトパピローマウイルスによって開始されていることが考えられる。しかし、その基本的メカニズムにかかわらず、本明細書で行われるIR顕微分光分析は、女性が頸部癌の危険を示すことができる。本明細書で説明される赤外技術は、この危険の程度、即ち頸部癌の低い又は高い危険性の程度を評価することもできる。

本願に言及される全ての出版物、特記及び特許出願は、各々個々の出版物、特許又は特記出願が引用により本明細書に組み込まれて詳細かつ個々に示されるのと同じ程度まで、本明細書に引用により組み込まれる。

先の発明は、理解の明快さの目的のため実例及び実施例によりいくらか詳細に記載されているが、添付の請求の範囲の範囲内において特定の変換及び改良を行うことができることは明らかであろう。

【图 1】

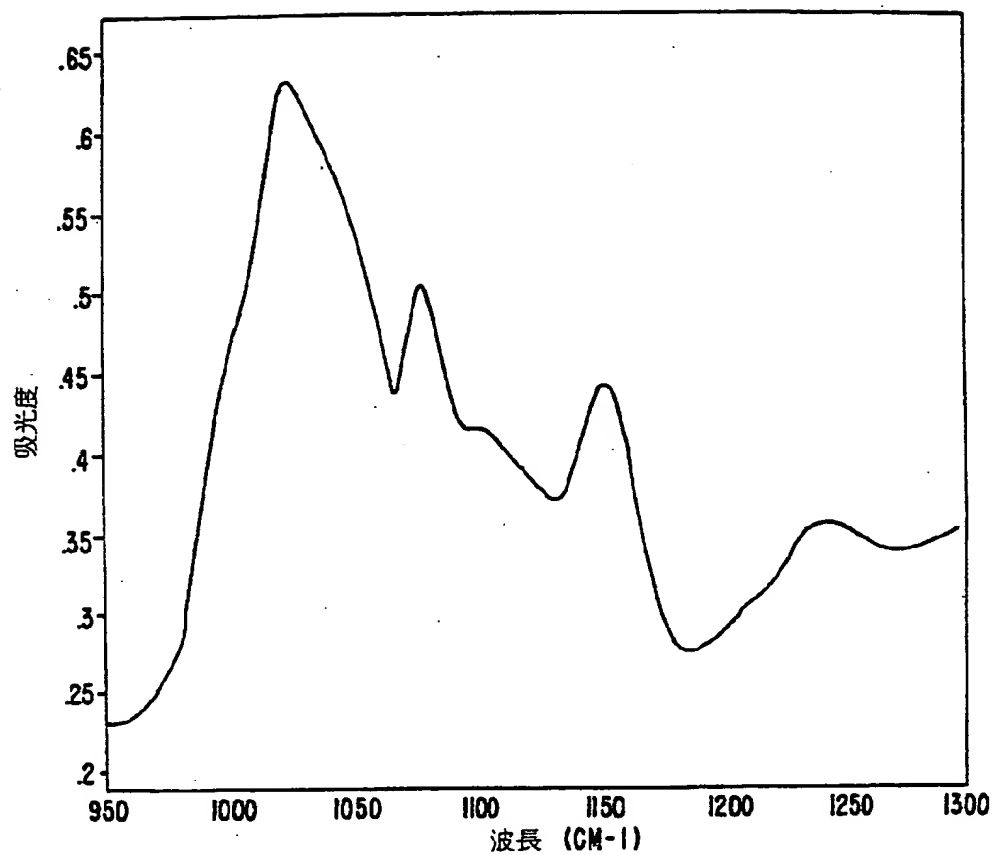


FIG. 1.

【图 2】

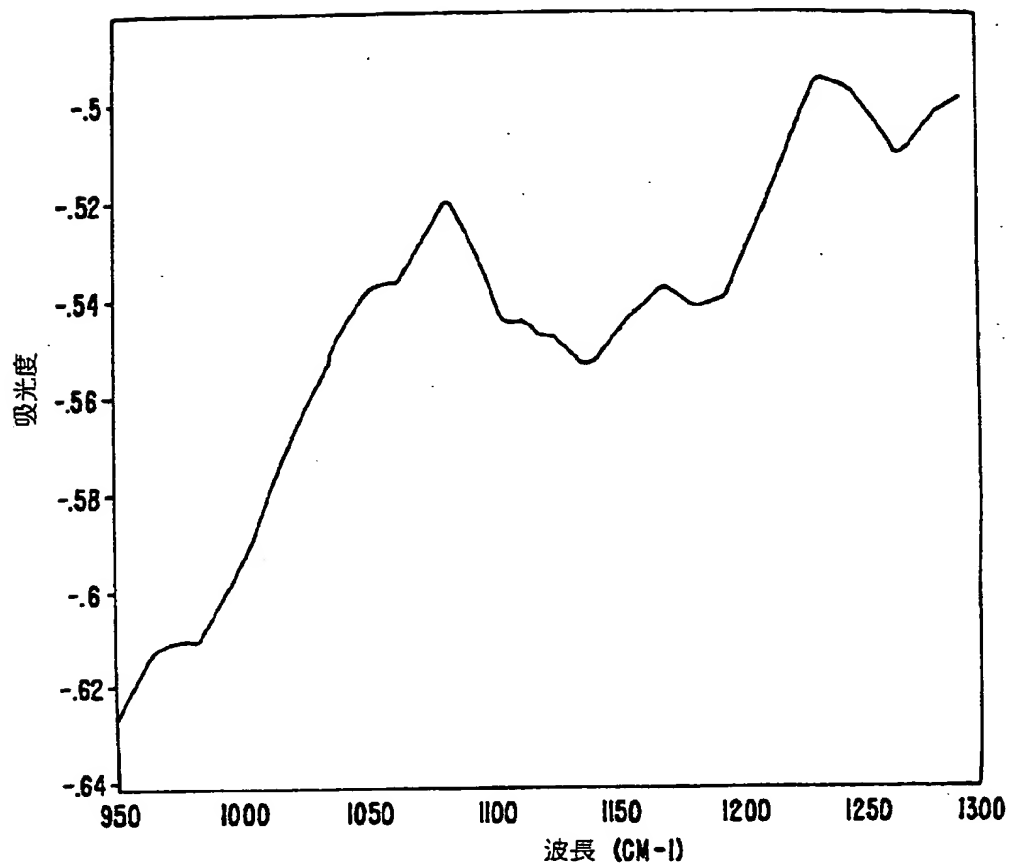


FIG. 2.

【図3】

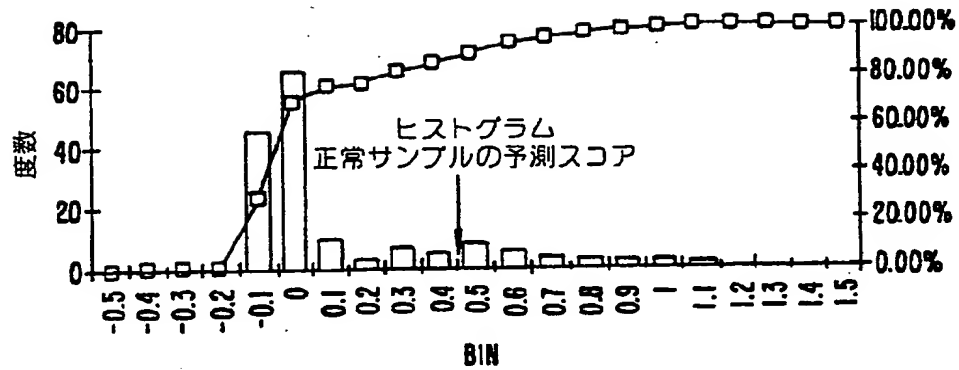


FIG. 3.

【図4】

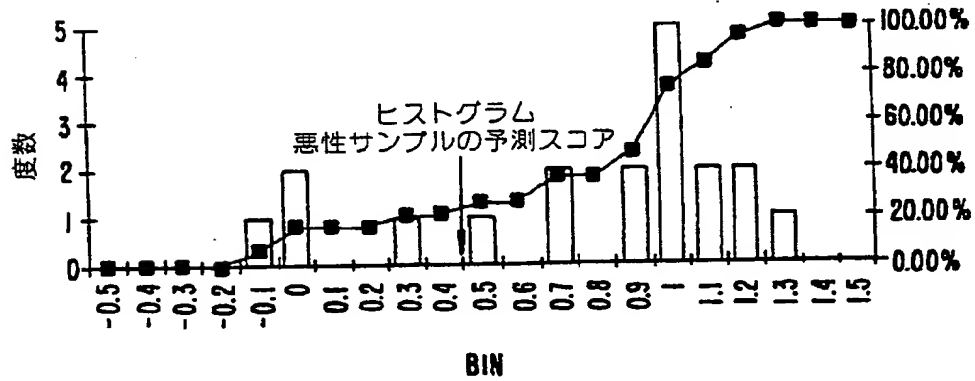


FIG. 4.



【图 5】

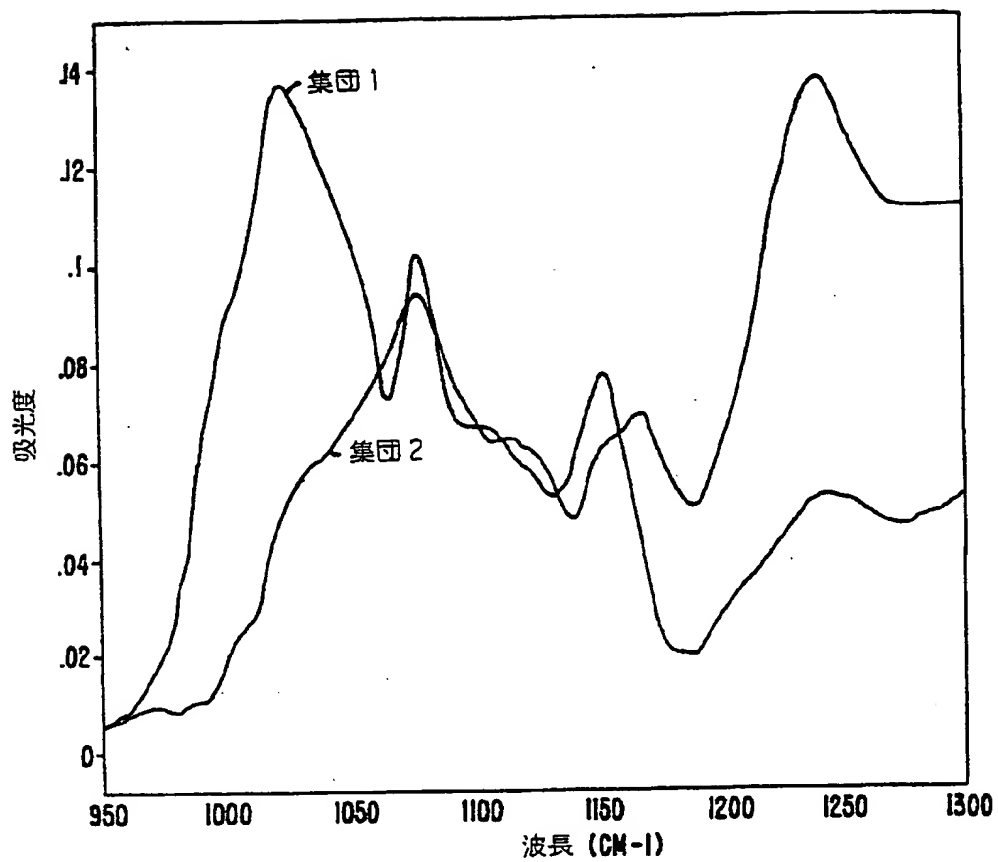


FIG. 5.

【圖 6】

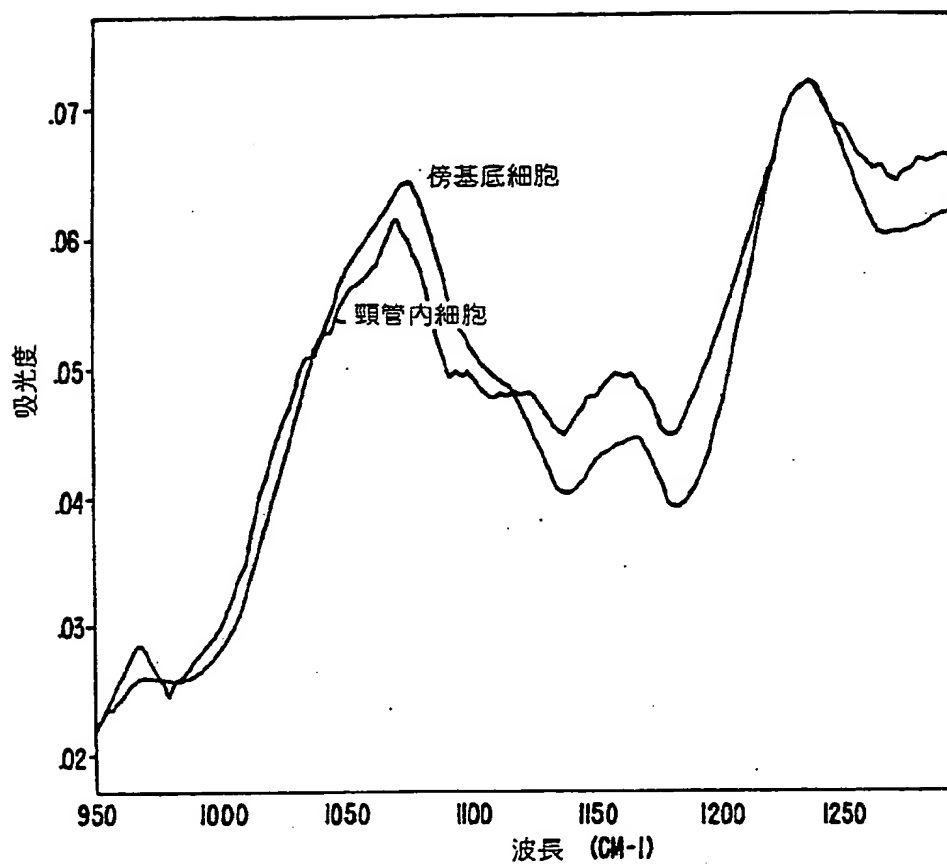


FIG. 6.

【圖 7】

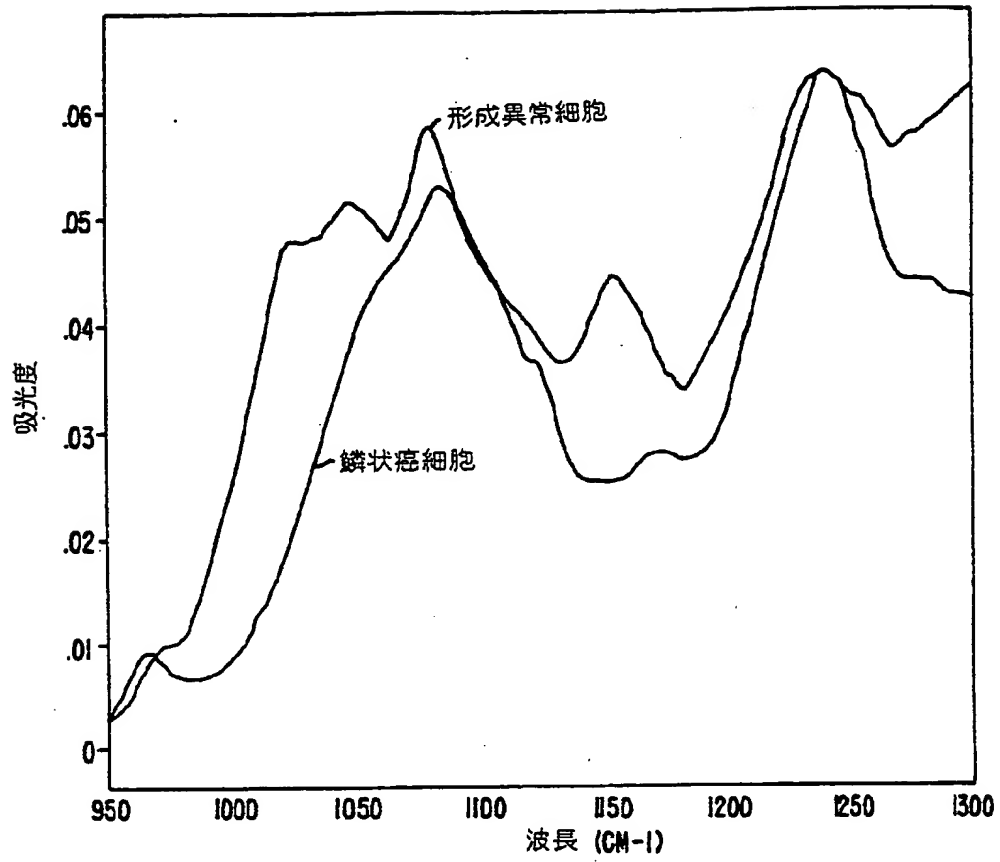


FIG. 7.

【図8】

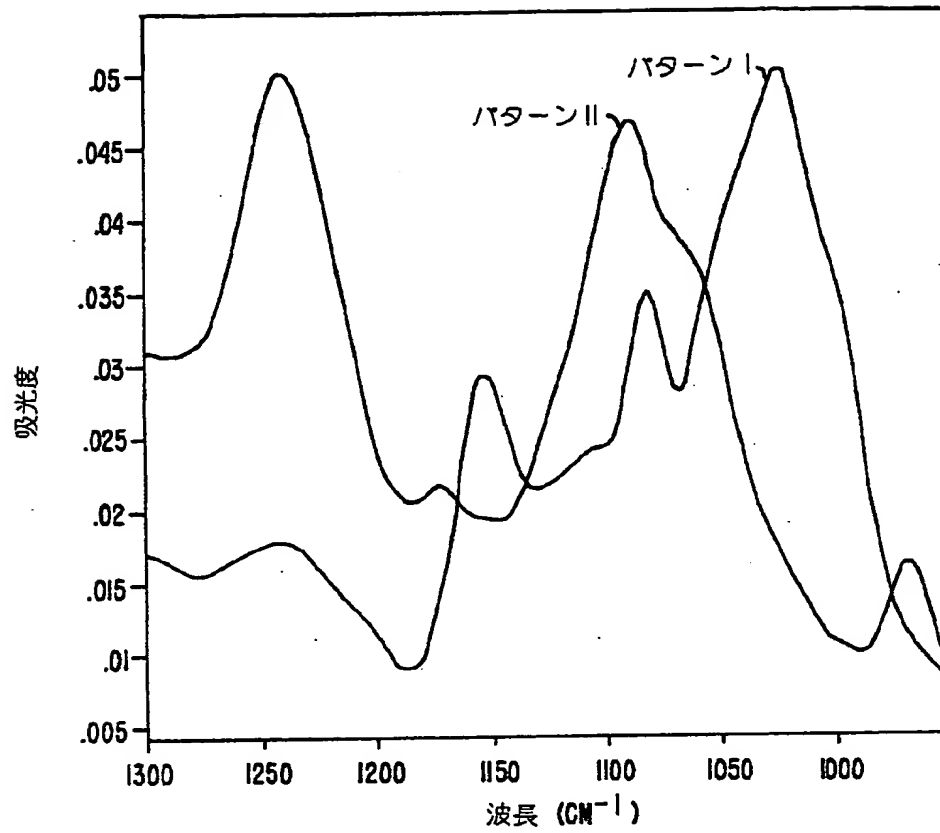


FIG. 8.

【図9】

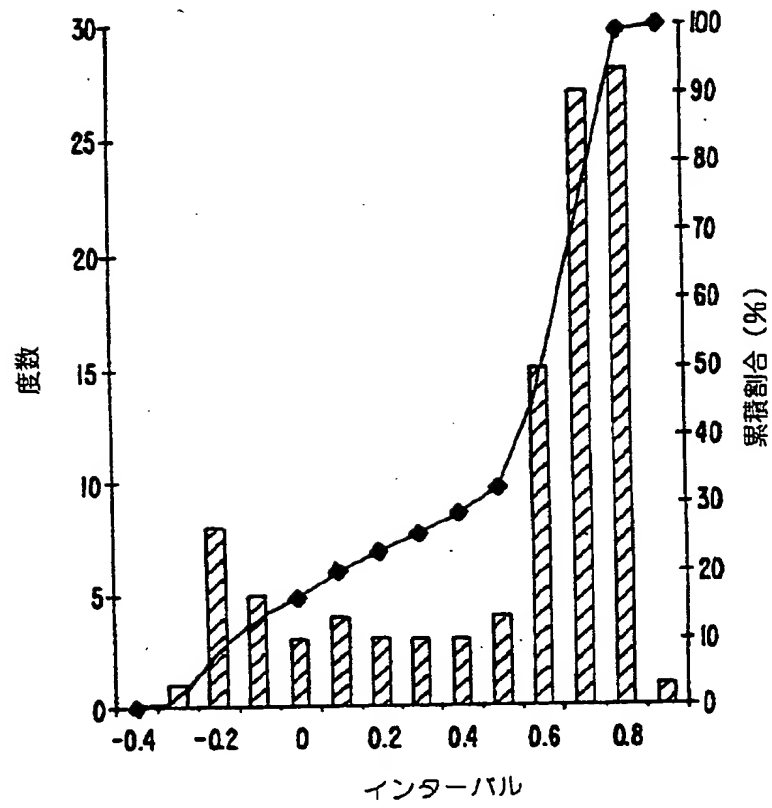


FIG. 9.

【図 10】

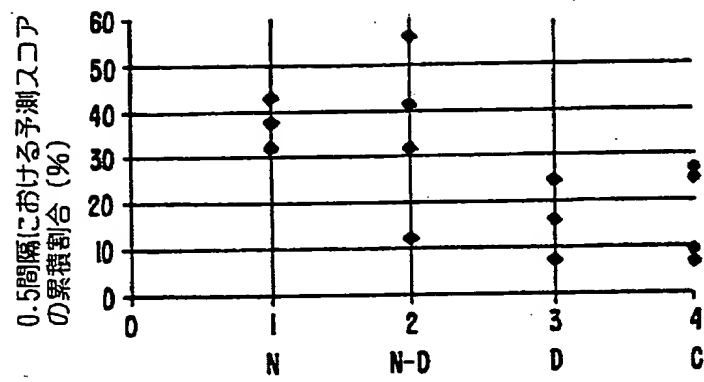
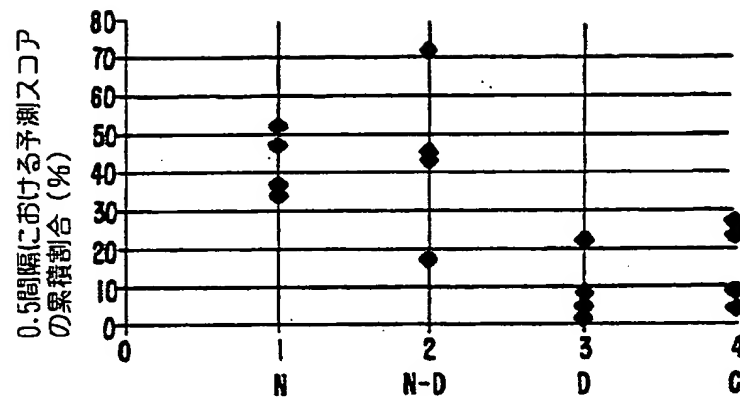


FIG. 10.

【図 1 1】

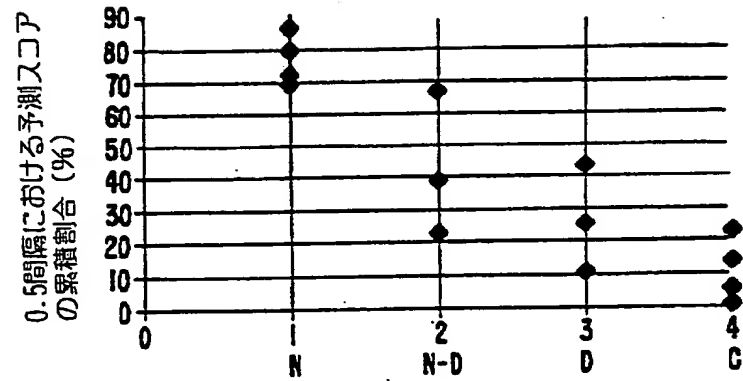


範囲	33%-52%	16%-71%	1%-22%	4%-27%
予測スコア, 平均±SEM	0.446±.02	0.445±.08	0.772±0.04	0.741±0.065
(全部で4のスミアに基づく)				

N = 正常スミア  
 N-D = 正常-形成異常スミア  
 D = 形成異常スミア  
 C = 悪性スミア

FIG. 11.

【図 12】



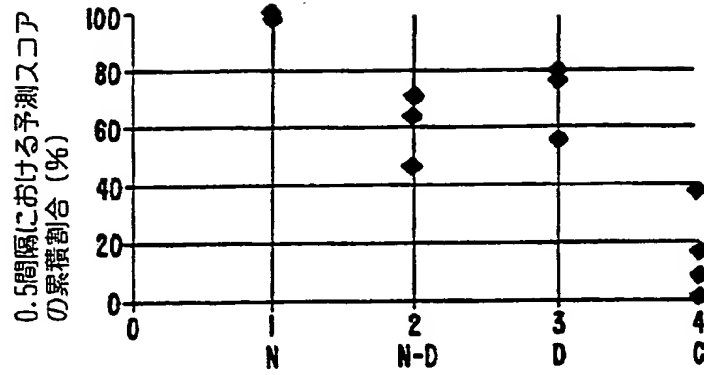
範囲	69%-87%	22%-67%	10%-43%	1%-23%
予測スコア, 平均±SEM	0.287±0.006	0.567±0.049	0.57±0.037	0.802±0.066
(全部で4のスミアに基づく)		*	*	

N = 正常スミア  
 N-D = 正常-形成異常スミア  
 D = 形成異常スミア  
 C = 悪性スミア  
 \* = 1以上の点のオーバーラップ

FIG. 12.



【図13】



範囲	98%-100%	45%-71%	55%-79%	1%-38%
予測スコア, 平均±SEM	0.006±0.047	0.422±0.056	0.329±0.046	0.783±0.09
(全部で4のスミアに基づく)	●	●	●	

N = 正常スミア  
 N-D = 正常-形成異常スミア  
 D = 形成異常スミア  
 C = 悪性スミア  
 ● = 1以上のデータ点のオーバーラップ

FIG. 13.

## 【手続補正書】

【提出日】 1998年6月18日

## 【補正内容】

## 請求の範囲

1. 剥離した頸部細胞サンプル内の悪性又は前悪性状態を同定するための方法であって、

(a) 赤外透過性マトリックス上で前記剥離した頸部細胞サンプルを乾燥させて乾燥細胞サンプルを作るステップと、

(b)  $3000 \sim 950 \text{ cm}^{-1}$ の周波数を有する中赤外光のビームを前記乾燥細胞サンプルにあてて、該乾燥細胞サンプルについての吸収データを作り出すステップと

(c) 前記乾燥細胞サンプルについての前記吸収データを、正常細胞、異常細胞並びに正常及び異常細胞の組合せからなる群から選択される代表的セットから得た赤外吸収データの検定／標準セットと比較して、前記悪性又は前悪性状態の特徴である赤外吸収における変化が、少なくとも1の周波数の範囲において前記乾燥細胞サンプル内でおこるか否かを決定するステップであって、前記比較が部分最小二乗法(PLS)、主成分分析(PCA)、主成分回帰(PCR)及び主成分分析を用いる主成分回帰(PCR/PCA)からなる群から選択される統計法を利用し、それにより前記悪性又は前悪性状態の同定を行うステップと、

を含む方法。

2. ステップ(a)の前に、前記剥離した頸部細胞サンプルを任意に保存液中に分散し、それにより前記サンプル中の非診断的デブリから前記頸部細胞を分離して、乾燥するための実質的に均一な細胞の懸濁液を供することを特徴とする請求項1に記載の方法。

3. 前記中赤外光のビームが個々の細胞の大きさの孔を通してあてられ、そして前記乾燥細胞サンプルについての前記吸収データが単一細胞について作り出されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

4. ホストにおいて悪性及び前悪性の頸部の状態を同定するための方法であって、

(a) 前記ホスト中の頸部細胞に光ファイバーを通して赤外光のビームをあてて前記細胞についての吸収データを作り出すステップと、

(b) 前記細胞についての前記吸収データを、正常、形成異常及び悪性の個体の代表的集団から調製した赤外吸収データの検定／標準セットと比較して、前記悪性又は前悪性状態の特徴である赤外吸収の変化が、少なくとも1の周波数の範囲において前記頸部細胞内でおこるか否かを決定するステップであって、前記比較が部分最小二乗法又は主成分分析統計法を利用し、それにより前記悪性又は前悪性状態の同定を行うステップと、

を含む方法。

5. 頸部の形成異常の高い危険性を有する患者を同定するための方法であって

(a) 頸部細胞サンプルの各々がソース又はパターンのいずれかにおいて互いに異なる少なくとも1の第1のスペクトルパターン及び少なくとも1の第2のスペクトルパターンを示す細胞の組合せを有する形成異常の経歴のない女性からとった頸部細胞からの吸収スペクトルの標準セットを作り出すステップと、

(b) 頸部細胞サンプルについての吸収データを作り出すステップと、

(c) 該吸収データを前記標準スペクトルと比較することにより前記形成異常についての高い危険性の同定を行うステップと、

を含む方法。

6. 前記スペクトル及び前記吸収データが、赤外、核磁気共鳴、フローサイトメトリー、及び紫外分光法からなる群から選択される分光法によって得られることを特徴とする請求項5に記載の方法。

7. 細胞サンプルと標準細胞サンプルとの間の化学的な差を検出するための赤外顕微分光法であって、

(a) 前記細胞サンプル中の個々の細胞に赤外光のビームをあてて前記個々の細胞についての吸収データを作り出すステップと、

(b) 該個々の細胞についての吸収データを、少なくとも1の標準細胞サンプルから得た赤外吸収スペクトルと比較して比較データを作り出すステップと、

(c) 該比較データの多変量分析を利用して前記吸収データについての予測されるスコアを作り出すステップであって、前記多変量分析が、部分最小二重法(PLS)、主成分回帰(PCR)及び主成分分析(PCA)からなる群から選択される1又は複数の技術を含むステップと、

(d) 該予測されるスコアからの度数分布プロフィールを作り、それにより前記化学的な差の赤外顕微分光検出を行うステップと、  
を含む方法。

8. 正常、前悪性及び悪性細胞間を区別するための赤外顕微分光法であって、

(a) 前記細胞サンプル中の個々の細胞に赤外光のビームをあてて前記個々の細胞についての吸収データを作り出すステップと、

(b) 前記吸収データを、少くとも1の正常、悪性又は前悪性であると細胞学的に決定されている標準細胞サンプルから得た赤外吸収スペクトルと比較して、比較データを作り出すステップと、

(c) 該比較データの多変量分析を利用して前記吸収データについての予測されるスコアを作り出すステップと、

(d) 該予測されるスコアからの度数分布プロフィールを作り、それにより正常、前悪性及び悪性細胞からなる群から選択される個々の細胞が赤外顕微分光法により区別され得るステップと、

を含む方法。

9. 細胞サンプルと標準細胞サンプルとの間の化学的な差を検出するための赤外イメージング法であって、

(a) 前記細胞サンプルに赤外光のビームをあてて前記細胞サンプルについての吸収データを作り出すステップと、

(b) 該吸収データを、少くとも1の標準細胞サンプルから得た赤外吸収スペクトルのピクセルごとの分析により作製された吸収スペクトルの検定/標準セットと比較して比較データを作り出すステップと、

(c) 該比較データの多変量分析を利用して前記吸収データについての予測されるスコアを作り出すステップと、

(d) 該予測されるスコアからの度数分布プロフィールを作り、それにより前記化学的な差の前記赤外イメージング検出を行うステップと、  
を含む方法。

10. 正常、前悪性及び悪性細胞間を区別するための赤外イメージング法であって、

(a) 前記細胞サンプルに赤外光のビームをあてて前記乾燥した細胞サンプルについての吸収データを作り出すステップと、

(b) 前記吸収データを、正常、前悪性及び悪性であると細胞学的に決定されている細胞からなる群から選択される1又は複数の細胞型から得た赤外吸収スペクトルのピクセルごとの分析により作製された赤外吸収スペクトルの検定標準セットと比較して、比較データを作り出すステップと、

(c) 該比較データの多変量分析を利用して前記吸収データについての予測されるスコアを作り出すステップと、

(d) 該予測されるスコアからの度数分布プロフィールを作り、それにより正常、前悪性及び悪性細胞の前記赤外イメージングでの区別が行われるステップと、

を含む方法。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. national application No.  
PCT/US96/18116

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(6) : G61B 5/00; G01N 21/35

US CL : 250/339.09, 339.12; 128/634, 653,1, 664

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 250/339.09, 339.12; 128/634, 653,1, 664

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A,P	US 5,539,207 A (Wong) 23 July 1996, see entire document.	1-30
A	US 5,435,309 A (Thomas et al.) 25 July 1995, see entire document.	1-12, 16-30
A	US 5,197,470 A (Helfer et al.) 30 March 1993, see entire document.	13-15
A	US 5,168,162 A (Oong et al.) 01 December 1992, see entire document.	1-12, 16-30
A	US 5,036,853 A (Jeffcoat et al.) 06 August 1991, see entire document.	13-15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	—	have document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	—	
*B* earlier document published on or after the international filing date	—	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
*L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	—	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
*O* documents referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	—	
*P* documents published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	—	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 JANUARY 1997

Date of mailing of the international search report

29 JAN 1997

Name and mailing address of the ISA/US  
Commissioner of Patents and Trademarks  
Box PCT  
Washington, D.C. 20231

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

EDWARD J. GLICK

Telephone No. (703) 305-4858

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)\*

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.6

識別記号

FI

G01N 33/50

G01N 1/28

L

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ, UG), UA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN

(72)発明者 バンデア, ブラシャント エス.

アメリカ合衆国, マサチューセッツ  
02714, アーリントン, オールド コロニー  
レーン 1, アpartment 9

(72)発明者 カーン, フレデリック

アメリカ合衆国, ニュージャージー  
08540, プリンストン, カスケイド コート  
113, アpartment 10

(72)発明者 クリシュナン, クリシュナスワミー

アメリカ合衆国, マサチューセッツ  
02061, ノーウェル, アール. エフ. ヒギンズ  
ドライブ 48

(72)発明者 リガス, バジル

アメリカ合衆国, ニューヨーク 10605,  
ホワイト プレインズ, ベイラー サークル  
12